



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

*Silenciamiento epigenético de caderinas clásicas y alteraciones
de las rutas de Wnt y Hedghog en células estromáticas y
timocitos de linfomas tímicos murinos*

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

María Matabuena de Yzaguirre

2007



D. José Fernández Piqueras, Catedrático de Genética de la U.A.M., y D. Javier Santos Hernández, Profesor Titular de Genética de la U.A.M, certifican que Dña. María Matabuena de Yzaguirre ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título:

Silenciamiento epigenético de caderinas clásicas y alteraciones de las rutas de Wnt y Hedghog en células estromáticas y timocitos de linfomas tímicos murinos

Revisado el presente trabajo, consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Prof. José Fernandez Piqueras
Catedrático de Genética, UAM

Prof. Javier Santos Hernández
Prof. Titular de Genética, UAM

A mis padres y a mis hermanos

Por quererme tanto...

Porque si me hubiesen dado la oportunidad de escoger a las mejores personas del mundo para acompañarme en la vida os habría elegido a vosotros de todas, todas; sin dudarlo un instante.

Porque siempre estáis ahí, pase lo que pase.

Sin vosotros este trabajo no tendría sentido, simplemente porque mi vida carecería de él...

A Raúl

Por ser mi “coach”...

Porque llenas de entusiasmo y ganas cada conversación sobre ciencia.

Porque a tu lado es fácil creer que todos los sacrificios “para salvar a los niños del mundo” merecen la pena. Haces que merezca la pena.

Sin ti no hubiese encontrado ni equilibrio ni fuerza para cerrar esta etapa y seguir adelante...

*“Aprender algo significa entrar en contacto con un mundo desconocido,
donde las cosas más simples son las más extraordinarias.”*

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

A mis jefes

Pepe, por enseñarme tanto... Genética general en tercero de carrera, ciencia a lo largo de estos años de tesis, a enseñar cuando dirigía a Marta en su Proyecto Fin de Carrera y cuando he impartido clase a los alumnos de Biología, de la vida en el día a día.

Por toda la comprensión y la paciencia conmigo cuando más lo he necesitado como persona.

Javier, por confiarme el cuidado de lo más valioso de nuestro trabajo, los ratones. Por hacerme llegar de manera tan directa que, después de todo, la idea de estudiar el estroma fue “mi gran idea”; no imaginas lo que supuso para mí tu reconocimiento...

A Pablo

Por ser como eres... Porque sin tu ánimo y confianza en mí no habría comenzado nunca esta aventura.

Por ser el compañero incansable que me procuró refugio en los momentos de máximo cansancio y que demostró que la fe mueve montañas. Sin ti habría abandonado y todo esto no existiría...

A mis compis del labo

Mónica, Michel, Pilar, Patri, Janet y Conchi, por recibirme y ayudarme en mis “primeros pasos” por el A-209.

A Nerea (Amparo!), por esos momentos... todos... que hicieron que fuésemos amigas. Gracias por ser como eres.

A María (Mery), por hacer que el deseo de cambiar “nuestro pequeño mundo” se hiciese realidad. Por ser un referente, a muchos niveles, tan cercano (¿quién “adoptó” a quién?). Por todos nuestros momentos que han dejado ver de un modo “silencioso”, sobre todo, en el tramo final, que los amigos están, simplemente, siempre...

A Manu, Laura, Majo y Rosa, por apoyarme y ofrecerse siempre. Laura... gracias por no apagar el móvil y saber animarme tan bien.

A Inma y a Montse, a Carolina y María Jesús, a los técnicos de laboratorio que he ayudado a formar, especialmente a Diana... fue realmente satisfactorio verte aprender, ¡y muy divertido celebrar contigo los “grandes acontecimientos” en la cafetería transparente!

A la gente del Departamento

Nargisse, por preguntar siempre cómo estoy, interesándote especialmente cuando la respuesta es “Hoy no muy bien...”

Miguel Pita, Mario, Paqui...por cigarros a las 9 de la tarde (cuando fumaba), cajas de forespán, Vectashield y no sé cuantas cosas más, por las mini-charlas en el pasillo y los saludos siempre alegres (aunque fuesen sacando la lengua!). Paqui me debes unas caipirinhas...

María Enciso, por hacer que las tardes de prácticas se alargasen en noches de juerga y risas que hacían saltar las lágrimas.

Rosa Roy, por toda tu ayuda con las prácticas, las búsquedas en internet y las charlas.

Carlos García de la Vega, por tu interés y tu tiempo para escuchar “mi vida”, por querer y creer en el “buen rollo”.

A Carlos Sentís Castaño, por estar tan pendiente.

A “las Adelas”, Pilar, Miguel y Paco y, sobre todo, a Paqui, por ayudarme tanto tanto con todo el papeleo, a Fernando y a Miguel Ángel...gracias por resolver mis dudas y problemas informáticos, por hacer horas extra para enseñarme cómo funcionan los micros, las cámaras y todo eso de lo que casi nunca me entero...

A la gente de citología: Paco, Jose, Paloma, Sergio, Alfonso, Santi, Angelita y Mada y toda la gente del laboratorio de Julio Sánchez Rufas, éste incluido, por ayudarme con el lector, el microscopio y los problemas informáticos de toda índole.

A los fenómenos del CBM

Marina, Patri, Sara, Sara Grande, Quique y Juan... gracias, gracias y mil gracias. Mary...por ser tan buena persona... por sacar tiempo de tu hora de la comida para ayudarme con las inmunoprecipitaciones, las citometrías, las células, los papeles, los miles de reactivos... ¡y con lo que hiciese falta! Por salvarme el ánimo.

Gloria, por reservarme siempre la hora en el espectro con tu nombre, por cuidar de mis RNAs e invitarme siempre a café...

Miguel Bordallo, por ayudarme tanto con los ratones y mi trabajo en el animalario.

Hugo, por ser un veterinario tan guay, por ser un amigo genial.

Isma y Fiti, por brindarme protocolos y buenas ideas.

A la gente del IIB

Mar, Esther, Diana, Maria Marta, Héctor, Eva, David, Miriam (o Victoria)... por brindarme vuestra ayuda sin escatimar en paciencia, protocolos, reactivos y buen humor.

Especialmente a Edu... tu cara de buena persona es reflejo fiel de lo que eres.

A la gente del CNB

Sonia, por acompañarme en busca de aparatos clave para salvar mis experimentos.

Sylvia, por todas las veces que has tenido que llamar para retrasar tu cita con el dentista, la hora de dejar el coche en el taller o llegar tarde a por los niños para terminar de pasar mis muestras... muchísimas gracias...

A mis compis de cursos de doctorado

Ali, Lola, Vero, Tais, Conchi, Cris, Alfonso, Jony... por todo lo pasado académicamente a lo largo de dos años y los grandes momentos que habéis creado riéndonos de TODO cada vez que quedábamos.

A Ángeles Juarraz

¿Cómo podría resumir todo el bien que ha supuesto tu presencia en este tramo de mi vida? No puedo...

Por ser mi ángel de la guarda... por cada frase de apoyo, de consuelo, por tu comprensión, por compartir

risas, preocupaciones y momentos difíciles, por querer celebrar conmigo las cosas buenas, por quedarte recogiendo el laboratorio a las 8 de la tarde mientras me echabas un ojo para asegurarte de que yo estaba bien, por relegar tus obligaciones cada vez que yo necesitaba tu ayuda con mis preparaciones, por descolgar el teléfono para darme tu sabia y experimentada opinión sobre las figuras, los textos, la ciencia y la vida... Por ser más que mi amiga... Por ser un ejemplo a seguir para mí (ya sabes que de mayor quiero ser como tú), por ser alguien tan cercano para todo el mundo, porque realmente demuestras que la prioridad de tu vida son las personas, porque das clase haciendo que a la gente le guste lo que enseñas, porque investigas “haciendo manos” a pesar de ser jefa de un laboratorio, porque te preocupas de verdad porque el programa de doctorado que coordinas sea mejor, porque, además, tienes tiempo para ser esposa y madre y tener amigos!!!

Gracias...

A mis amigos

Laurita (Paka!), por todo lo que compartes conmigo que tanto me ayuda siempre... Por acercarme a la universidad a traer los papeles a última hora (ahhh!!!).

Nury, por tu ayuda con los sujetos y los predicados... Merce, por tu ayuda con los términos médicos...

Rafa y Eva, por ayudarme con el escaneado de las imágenes y por tener una habitación reservada siempre, por cuidarme tanto, tanto...

Miri, Elena (sor recato y ‘sor-sua’) y Eli, por tantos años compartidos, por animarme a seguir por este camino más inseguro e incierto que otros y pagar siempre las cañas... A Silvia, porque a pesar de no poder quedar más que dos veces al año parece que no pasa tiempo sin vernos.

Mariajo, Miriam, Cris, Luis, Lucho, Miguel... A todos por estar siempre interesados en lo que concierne a este trabajo a pesar de que, la mayoría no tenéis ni idea de qué narices es eso del estroma! Por estar siempre ahí, cerca...

A Iván, por tus buenos consejos informáticos y toda tu ayuda como si fueses mi asistente técnico particular, dispuesto a ayudarme en cualquier momento.

A mi familia

Papá, por ser mi principal referente, mi motor, un ejemplo a seguir, pero sobre todo, alguien a quien admiro por encima de todo porque siendo tan humano como cualquiera siempre quieres superarte y ser mejor. Por todos tus sacrificios y tus renunciás, especialmente en tu trabajo, que tanto me han enseñado y han hecho que me sienta profundamente comprendida por ti... Por darme todo, absolutamente todo...

Mamá, por ser especial, aunque muchas veces no nos entendamos... Por toda tu paciencia, por hacerme la comida y estar pendiente de lo que me falta para que pueda dedicarme a mi vida y a mi tesis... Porque tienes tantas cosas buenas que nunca te digo... Te quiero

Dani, Leny, por vuestra manera de vivir... Sois los mejores amigos que alguien podría tener y algunas personas tienen la suerte de saberlo y experimentarlo. No tengo palabras para expresar lo especiales que

sois para mí, mis peques...Hacéis que mi vida sea mejor porque con vosotros al lado, es como estar entre algodones...

Cuñaaaao, gracias por todos esos truquillos que me has enseñado para hacer videos con todo ese buen humor que derrochas...

A mis abuelitos, especialmente a Fermín y a Taquí... A mi madrina, para ti mis palabras son que no tengo palabras (ya nos tomaremos unos vinitos)...porque habéis sido, sois y seréis faro y refugio, por acompañarme siempre. A mi padrino, por toda tu calma y tus silencios y palabras siempre tan oportunos...

A mis tíos, especialmente a John y a Claire, por su presencia sutil pero tan importante, por darme equilibrio... Teresa, por tus experiencias compartidas en un camino parecido al mío... A mi tito Julio... decirte... ¿para qué voy a decirte si con mirarnos nos entendemos? A Luis, por tener siempre, siempre una palabra de aliento. Dani, Paco, José... A mis primos, por llorar y reírnos y reírnos y reírnos...

A Raúl

Eres la persona que más sabe de “mi trabajo” en esta última etapa... Gracias por haber estado ahí, por llamar interesándote SIEMPRE, por tu perspectiva, por tu visión e ideas, las fotos, los vídeos, por ayudarme con las referencias y con la maquetación, por tu apoyo y tu consuelo que tan bien me han “levantado”, por tus ganas de aprender sobre el estroma y los timocitos y el cáncer y la biología y la vida...

Gracias por ser mi compañero, mi mejor amigo y mi confidente. Gracias por compartir todo lo que eres y ayudarme tanto, tanto a mejorar. Tus ayudas han dado tanta calidad a esta tesis y a mi vida que no hay gracias suficientes...

RESUMEN

Nuestro equipo ha estudiado en los últimos años una amplia colección de linfomas tímicos inducidos con radiación γ en cepas susceptibles de ratón. En este estudio se realiza un análisis histológico y citológico, mediante citometría de flujo, para caracterizar las muestras tumorales que responden a las características de los linfomas linfoblásticos de tipo T. Aunque ya existen evidencias previas de la alteración en genes controladores del ciclo celular o la apoptosis, no existen datos suficientes sobre alteraciones en las moléculas de adhesión o en componentes de las vías de Wnt y de Hedgehog (Hh), que son imprescindibles para el control de la supervivencia y proliferación de los timocitos.

Nuestros datos demuestran la inactivación epigenética de los genes de las caderinas E (*Cdh1*) y N (*Cdh2*), que se expresan esencialmente en la fracción estromática, contraviniendo la hipótesis del “intercambio de caderinas” descrito en tumores sólidos. Estos resultados, junto con la demostración de alteraciones morfológicas y de ejecución de programas apoptóticos de las células estromáticas, sugieren la importancia de las alteraciones en el micro-ambiente tímico (estroma) y no solamente en las células tumorales *per se*. El análisis comparativo de los patrones de expresión de componentes de las vías de Wnt y Hh demuestra que la sobre-expresión de *Fos11* y la disminución de *Aes*, en la fracción estromática de los tumores, podrían estar actuando en la misma línea, y pone de manifiesto nuevas alteraciones en los timocitos tumorales, como la sobre-expresión de *Wnt9a* (y en una fracción de linfomas también del gen *Wnt4*) y la disminución de *Apc*, que podrían favorecer la sobre-expresión del oncogen *c-Myc* como consecuencia de la activación de la vía Wnt. En cuanto a la vía de Hedgehog, el hecho más significativo en nuestros tumores es la sobre-expresión de *Smo*, el único componente no-redundante de esta vía, en las dos fracciones celulares que podría estar facilitando la supervivencia de los linfocitos inmaduros tumorales, colaborando así con la ruta de Wnt.

SUMMARY

During the last years, we have studied a large collection of γ -radiation-induced thymic lymphomas from susceptible mouse strains. In this study, we determine by histological and flow cytometry analyses that tumour samples are T-cell-lymphoblastic lymphomas. Some alterations in cell cycle or apoptosis genes have been implicated in the development of this kind of tumours. However, no evidence demonstrates alterations of adhesion molecules or members of Wnt and Hedgehog (Hh) signalling pathways, which are essential for thymocyte survival and proliferation control.

Here we demonstrate the epigenetic inactivation of *E-* (*Cdh1*) and *N-cadherin* (*Cdh2*) genes, expressed by thymic stromal cells. These results contradict the “cadherin switch” observed in solid tumours. On the other hand, we analyze transcriptional levels of members from Wnt and Hh signalling pathways. In thymic stromal cells, we show *Fos11* up-regulation and *Aes* down-regulation. These results, together with stromal cell morphological alterations and cellular death by apoptosis, suggest the importance of thymus-microenvironment disturbance in the development of these kind of tumours (i.e. the tumour-associated alterations are not in the tumour cells *per se*, but in the stromal cells). We show alterations in tumour thymocytes, *Wnt9a* (and *Wnt4a* in a fraction of lymphomas) up-regulation and *Apc* down-regulation, which could drive the Wnt pathway activation and the oncogene *cMyc* up-regulation. The most significant change in the Hh pathway is the up-regulation in both cell fractions of *Smo*, which might contribute to the survival of tumour immature thymocytes, and might cooperate with the effect on the Wnt pathway.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	0
RESUMEN.....	5
SUMMARY	7
INDICE	9
INTRODUCCIÓN.....	13
1. CÁNCER.....	14
2. LOS LINFOMAS	18
3. EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS T EN EL TIMO	22
3.1 El timo.....	22
3.2. Vías de señalización implicadas.....	26
3.2.1. La vía de Notch.....	26
3.2.2. La vía de Hedgehog.....	26
3.2.3. La vía de Wnt.....	28
3.2.4. El papel de las uniones adherentes.....	30
4. ALTERACIONES GÉNICAS EN LINFOMAS TÍMICOS DE RATÓN	32
OBJETIVOS	33
RESULTADOS.....	35
OBJETIVO 1.....	36
1. 1. CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS: MODELO ANIMAL Y TRATAMIENTOS	37
1.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	40
1.2.1. Alteraciones morfológicas generales.....	40
1.2.2. Análisis citológico mediante citometría de flujo	44
1.2.3. Alteraciones morfológicas en células estromáticas.....	44
1.3 CUANTIFICACIÓN DE LA APOPTOSIS EN FRACCIONES CELULARES ENRIQUECIDAS	48
OBJETIVO 2.....	51
2.1. ANÁLISIS DE LOH Y MUTACIONAL MEDIANTE SSCP	52
2.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN	53
2.3 MECANISMOS RESPONSABLES DE LAS ALTERACIONES TRANSCRIPCIONALES	53
2.3.1 Hipermetilación de regiones promotoras.....	53
2.3.2 Expresión transcripcional de Sna1	58

2.4 ANÁLISIS DE NIVELES DE PROTEÍNAS CADERINAS E Y N EN LINFOMAS LINFOBLÁSTICOS	58
2.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE CADERINAS E Y N EN MUESTRAS SOMETIDAS A DISTINTOS TRATAMIENTOS	62
2.5.1 Inmunofluorescencia	62
2.5.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real	65
OBJETIVO 3.....	67
3.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS VÍAS DE WNT Y HH MEDIANTE MATRICES	68
3.2 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MÁS DETALLADO DE LOS GENES SELECCIONADOS	72
3.2.1 En muestras de ratones no irradiados	72
3.2.2 En muestras de ratones irradiados con dosis única	72
3.2.3 En muestras de ratones que desarrollaron linfoma linfoblástico	75
DISCUSIÓN.....	80
1. LA INACTIVACIÓN DE LOS GENES Cdh1 y 2, QUE CODIFICAN PARA DOS CADERINAS CLÁSICAS, PODRÍA CONTRIBUIR AL DESARROLLO DE LOS LINFOMAS LINFOBLÁSTICOS T MEDIANTE LA ALTERACIÓN DE LOS MECANISMOS DE COMUNICACIÓN INTERCELULAR	81
2. LOS TUMORES PRESENTAN ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LAS VÍAS DE WNT Y HEDGHOG	86
2.1.- Alteraciones de la vía de Wnt en el desarrollo tumoral	86
2.2.- Alteraciones de la vía de Hh en el desarrollo tumoral	87
3. EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN FRACCIONES SEPARADAS DE COMPONENTES DE AMBAS VÍAS DEMUESTRA LA CO-EVOLUCIÓN DE ALTERACIONES EN TIMOCITOS Y ESTROMA EN LOS LINFOMAS LINFOBLÁSTICOS	88
CONCLUSIONES	90
MATERIALES Y MÉTODOS.....	92
1. RATONES	93
2. TRATAMIENTOS CON RADIACIÓN γ	93
3. HISTOLOGÍA	94
4. SEPARACIÓN DE FRACCIONES CELULARES	94
5. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	95
6. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (ADN Y ARN) Y PROTEÍNAS	95
7. PCR.....	96

<i>8. SSCP</i>	97
<i>9. PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP)</i>	97
<i>10. SECUENCIACIÓN DE ADN</i>	98
<i>11. MATRICES (ARRAYS) DE ADNc</i>	98
<i>12. RT-PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (LIGHTCYCLER)</i>	99
<i>13. WESTERN BLOT</i>	100
<i>14. INMUNOFLUORESCENCIA</i>	101
<i>15. INMUNOPRECIPITACIÓN</i>	102
<i>16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	103
BIBLIOGRAFÍA	108
ABREVIATURAS	115
ANEXO	118






INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El término cáncer proviene de la palabra griega, *karkinoma* (y de su equivalente latino *cancer*), que daba nombre al proceso de crecimiento radial infiltrante de algunos tumores de mama a modo del cuerpo de un cangrejo, acuñada por Hipócrates cuatro siglos antes de Cristo.

En términos clínicos, el cáncer es un grupo de enfermedades (cáncer de pulmón, de estómago, de hígado, colorrectales, esofágicos, de páncreas, de vejiga, renal, hematológicos, de próstata, de mama, de cerviz, de ovario...) que se producen cuando hay un crecimiento masivo e incontrolado de células que han ido acumulando alteraciones genéticas a lo largo del tiempo, que dañan a otras células o tejidos sanos, y que pueden llegar a impedir el funcionamiento normal del organismo en el que se desarrolla este proceso.

En el año 2000, Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg [1] propusieron seis características que podrían ser consideradas como eventos necesarios para el crecimiento maligno:

-  1. *Aumento de estímulos que promueven el crecimiento:* disparo de la división celular debido al descontrol de las señales mitogénicas.
-  2. *Insensibilidad ante señales antiproliferativas:* se evitan estados de quiescencia y diferenciación.
-  3. *Evasión de la apoptosis:* se permite la proliferación de células con daños irreparables.
-  4. *Potencial replicativo ilimitado:* células con un grado de alteración alto pueden evitar el estado de senescencia (bloqueo irreversible del crecimiento) y proliferar.
-  5. *Angiogénesis:* capacidad de generar vasos sanguíneos que aporten el oxígeno y los nutrientes necesarios para la supervivencia del tumor.

- ⚡ 6. **Metástasis:** capacidad de las células de masas cancerosas primarias de migrar a otros tejidos y generar nuevas colonias tumorales.

Estos cambios son la manifestación de alteraciones de vías de comunicación entre las células y con su entorno (células vecinas o matriz extracelular) o de vías de señalización intracelulares, que afectan la interacción entre moléculas de una misma ruta o con otras relacionadas. Así, el comportamiento celular podría asemejarse al funcionamiento de un circuito integrado electrónico en términos de sus partes constituyentes (**Figura 1**), de modo que existen componentes interconectados que procesan las señales recibidas tanto del exterior como del interior para poder emitir las

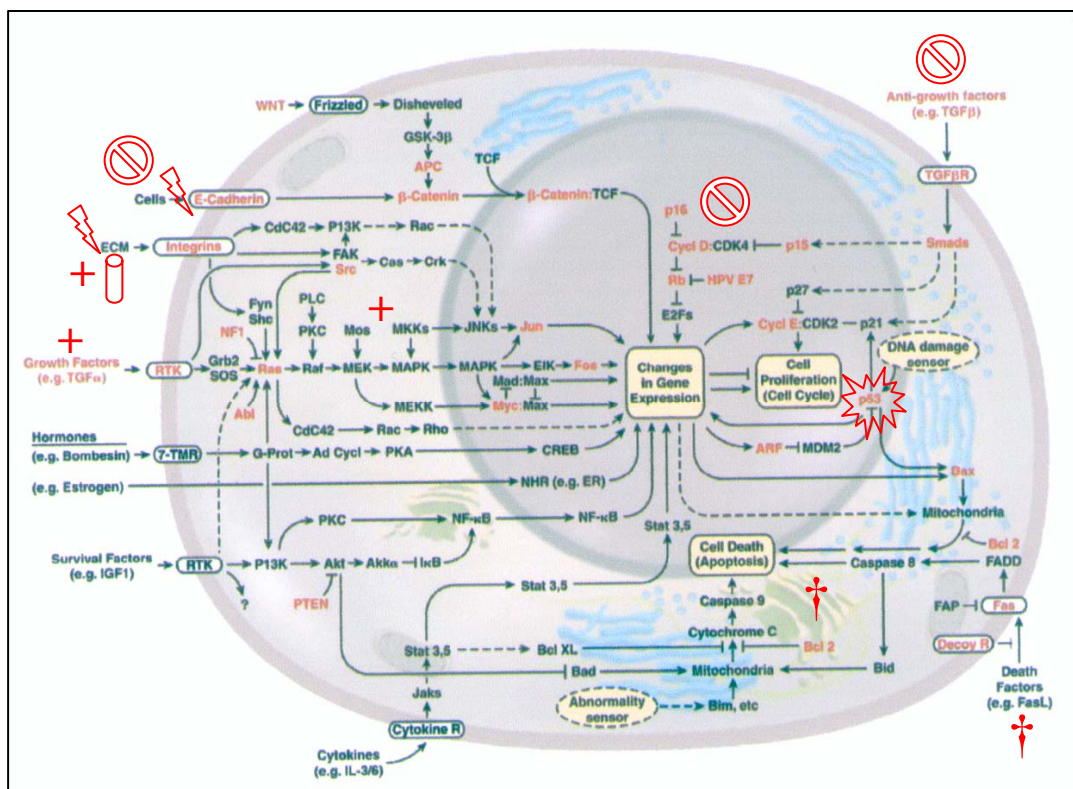


Figura 1. Circuito integrado de la célula. La información llega desde el exterior y del interior y es procesada por receptores y sensores respectivamente. La transmisión de señales se produce mediante interacciones entre las diferentes moléculas de las rutas correspondientes y la célula responde dividiéndose, muriendo, bloqueando la proliferación o diferenciándose. Los distintos símbolos indican los puntos en los que se pueden dar las diferentes alteraciones que rompen el equilibrio natural del sistema favoreciendo la aparición de un determinado tipo de cáncer.

Modificado a partir de (Hanahan&Weinberg, 2000).

respuestas adecuadas mediante la expresión de genes concretos [2]. De este modo, las capacidades anteriormente mencionadas pueden ser adquiridas por diferentes mecanismos en cada caso: por cambios en las señales externas/receptores, por alteraciones en los componentes de las rutas que transmiten las señales desde los receptores activados por ligando o por disfunción de moléculas efectoras.

A su vez, todos los cambios en las vías de señalización tienen su origen en alteraciones de los genes que codifican para cada uno de sus componentes [3], distinguiéndose:

1. Oncogenes

Derivan de genes que promueven el crecimiento o inhiben la muerte celular o la parada del ciclo celular (proto-oncogenes). La mutación de los protooncogenes hacia oncogenes implica la activación constitutiva del gen o la activación en determinadas circunstancias bajo las que el gen inalterado no ejercería su función.

2. Genes supresores de tumores

Un gen supresor de tumor es aquel factor genético cuya inactivación impide a la célula detener su progresión a lo largo del ciclo celular, diferenciarse, permanecer latente o morir. La mutación de este tipo de genes reduce (o anula) la actividad del producto para el que codifica.

3. “Genes de estabilidad o Caretakers”

Son genes implicados en reparación del ADN y su inactivación implica el aumento de las mutaciones en otros, es decir, favorecen la inestabilidad genética.

4. Genes Modificadores

Son genes que modulan la expresión fenotípica de las mutaciones en oncogenes o genes supresores de tumores. Pueden conferir resistencia o susceptibilidad al

desarrollo de un determinado tipo de cáncer, agravar o atenuar un determinado fenotipo tumoral e influir en la respuesta a tratamientos [94].

Los mecanismos genéticos más frecuentes por los que se activan los oncogenes pueden ser translocaciones cromosómicas, amplificaciones de dosis génica o mutaciones intragénicas que afectan a residuos críticos en la actividad del producto del gen; y la inactivación de los genes supresores y los genes de reparación suele suceder mediante mutaciones sin sentido en residuos esenciales para su actividad, mutaciones que generan una proteína truncada o delecciones/inserciones de varios tamaños [3]. Además, la regulación epigenética contribuye junto a las alteraciones genéticas al desarrollo del cáncer. Mientras que la hipermetilación de secuencias promotoras de genes supresores de tumores promueve la tumorigénesis, la hipometilación global del genoma podría favorecer la expresión de oncogenes e inducir inestabilidad genómica [4].

En resumen, la tumorigénesis es un proceso multifásico que depende tanto de los cambios genéticos y epigenéticos adquiridos secuencialmente, como de las interacciones entre las células tumorales y sus vecinas normales, y cuya consecuencia es el desequilibrio entre los procesos de proliferación y muerte-senescencia que en definitiva, determinan el grado de crecimiento de un tumor concreto. Es importante tener en cuenta que una mutación concreta podría tener un efecto diferente en distintos tipos celulares e incluso en una misma clase de células [3]. De este modo la secuencia particular de cambios varía ampliamente incluso dentro del mismo tipo de tumores. Además, las respuestas de las células también se verán afectadas por el tipo de interacción entre ellas y con su ambiente externo.

2. Los linfomas

En una revisión reciente de la Asociación Española Contra el Cáncer [98], se concluye que el cáncer es la tercera causa de muerte tras las enfermedades cardiovasculares y las infecciosas (**Figura 2**).

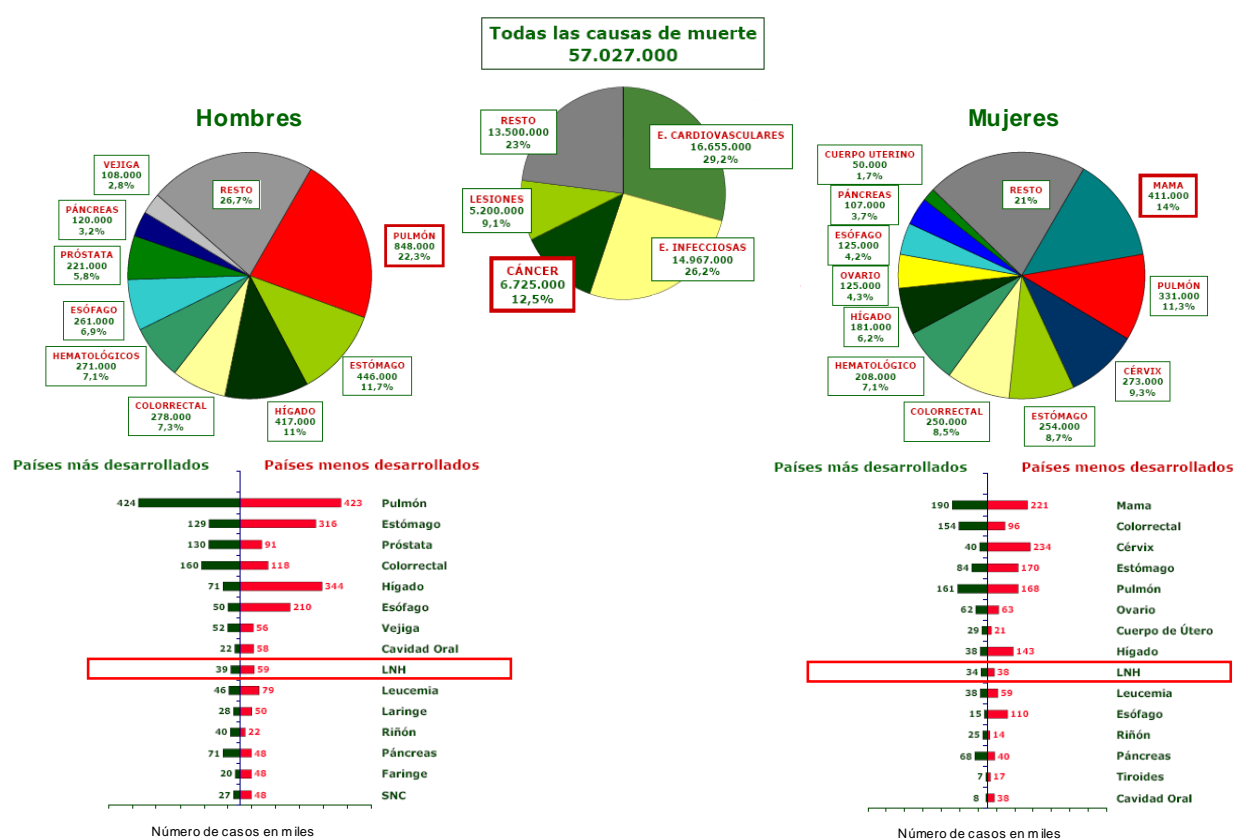
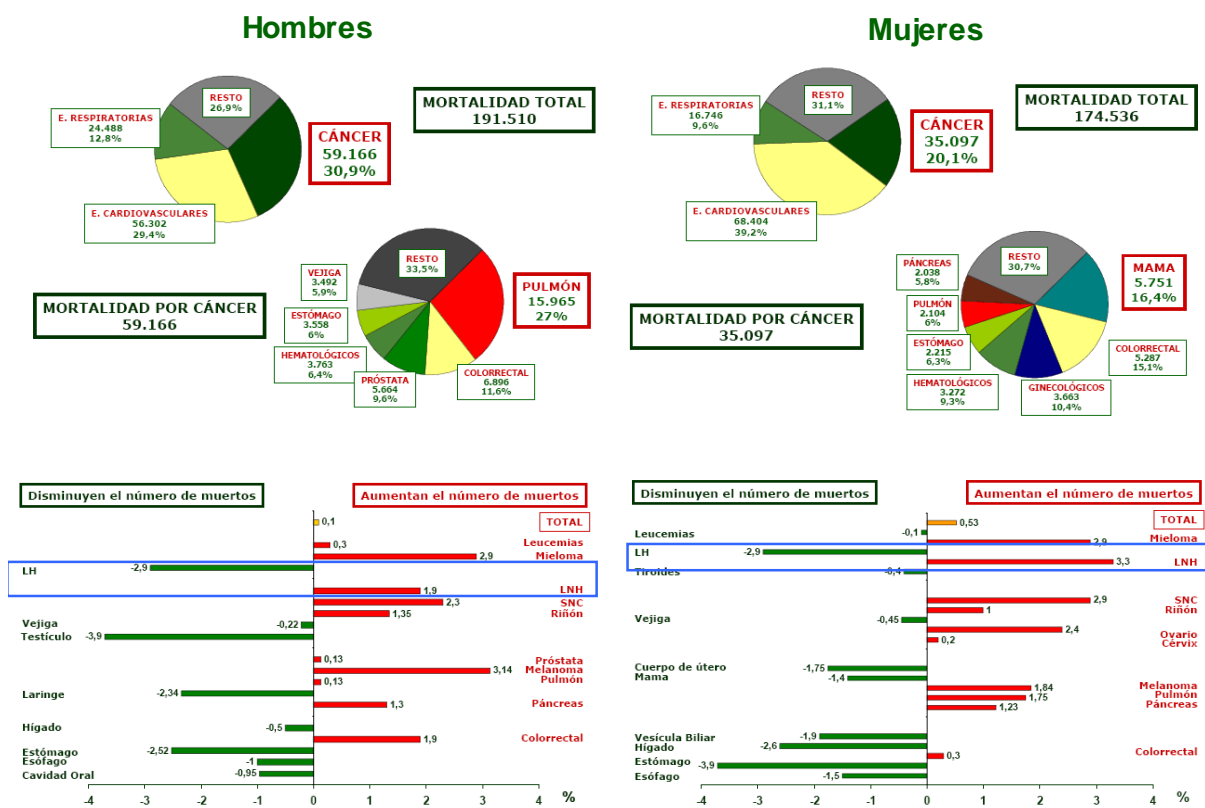


Figura 2. Tasas mundiales de mortalidad por cáncer en las poblaciones masculina y femenina. Los cánceres hematológicos son una causa de muerte relativamente frecuente, tanto entre hombres como entre mujeres.

Modificado a partir de la revisión de las estadísticas de cáncer, por la Asociación Española Contra el Cáncer (11/7/2006).

Los cánceres hematológicos, entre los que se encuentran los linfomas, son el quinto y sexto tipo de cáncer que más muertes causa en hombres y mujeres respectivamente. Concretamente, el linfoma No Hodgkin ocupa los puestos undécimo y octavo entre los cánceres que afectan a la población masculina, en países desarrollados



Por otro lado, el cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil (edades entre 1 y 14 años), siendo los hematológicos (leucemias y linfomas) los que causan mayor número de muertes [97].

Los linfomas son cánceres hematológicos porque derivan de células de la sangre (los linfocitos o células blancas), del tejido linfático que forma parte del sistema inmune. Existen dos tipos de linfocitos, los B y los T, originados en la médula ósea y en el timo respectivamente.

Los linfomas se pueden subdividir en:

- Linfoma de Hodgkin: descrito por primera vez por el Dr. Thomas Hodgkin en 1832 y caracterizado por la presencia de células tumorales anómalas particulares, denominadas de Reed Sternberg (apellidos de los médicos que las describieron en detalle por primera vez).
- Linfoma no Hodgkin: aquí se incluyen todos los demás tipos. La clasificación del linfoma no Hodgkin más reciente es la *Revised European-American Lymphoma* de la Organización Mundial de la Salud (*REAL/WHO*) y considera el lugar donde se asienta el tumor, la apariencia de las células, sus características cromosómicas y su bioquímica (evaluada por la presencia de ciertas moléculas en la superficie de las células B ó T). Concretamente, los linfomas humanos de tipo T se forman a partir de linfocitos T en diferentes etapas de su maduración y se pueden clasificar en dos grandes categorías: linfomas linfoblásticos de células precursoras (constituidos por timocitos inmaduros), y linfomas T periféricos (que se originan a partir de linfocitos post-tímicos maduros). Se trata de tumores relativamente poco frecuentes que representan el 10-20% de los linfomas no-Hodgkin en los países occidentales. Los linfomas T suelen ser clínicamente muy agresivos, y tienen peores tasas de supervivencia y de respuesta al tratamiento que los de tipo B.

Por otro lado, su gran diversidad morfológica obliga a definir muchos subtipos clínicos; además, no hay buenos marcadores inmunofenotípicos de clonalidad y escasean los datos necesarios sobre las alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo de los tumores.

3. El desarrollo de las células T en el timo

3.1 El timo

El timo es un órgano linfoide primario que junto con la médula ósea, el bazo, los ganglios linfáticos y las amígdalas, forma parte del Sistema Inmune. Es esencial para la maduración de los linfocitos T y por tanto, para garantizar la respuesta inmunitaria que protege al organismo frente a los daños provocados por agentes exógenos [96].

El timo está formado por dos lóbulos unidos mediante tejido conjuntivo. Cada uno de ellos está recubierto, a su vez, por una cápsula fina de tejido conjuntivo laxo y subdividido, por septos mesenquimales, en lobulillos que contienen dos regiones claramente diferenciadas histológicamente: corteza (periférica), cuyo componente mayoritario son los timocitos (linfocitos tímicos) en distintos estadios de maduración; y médula (interior), formada principalmente por las células estromáticas (**Figura 4**).

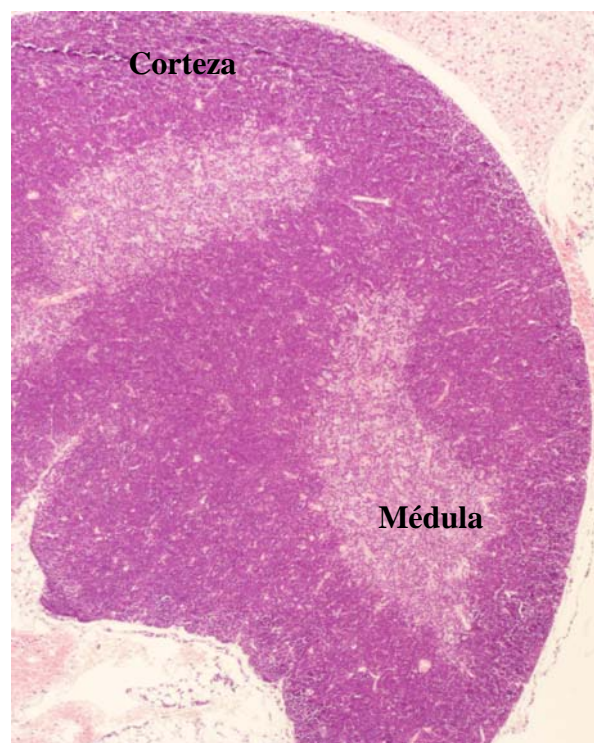


Figura 4. Sección de timo de ratón. Tinción con Hematosilina&Eosina, mediante la cual se pueden apreciar las zonas de corteza y médula en un lobulillo.

El estroma tímico está compuesto principalmente por células epiteliales corticales y medulares, además de fibroblastos mesenquimales, macrófagos, células endoteliales, dendríticas, neuroendocrinas y células troncales [5]. Este conjunto forma una red tridimensional, que no sólo dota de soporte físico a los timocitos, sino que además, debido a la secreción de factores de crecimiento y a los contactos célula-célula [6], proporciona el micro-ambiente adecuado para la maduración de los timocitos (Figura 5).

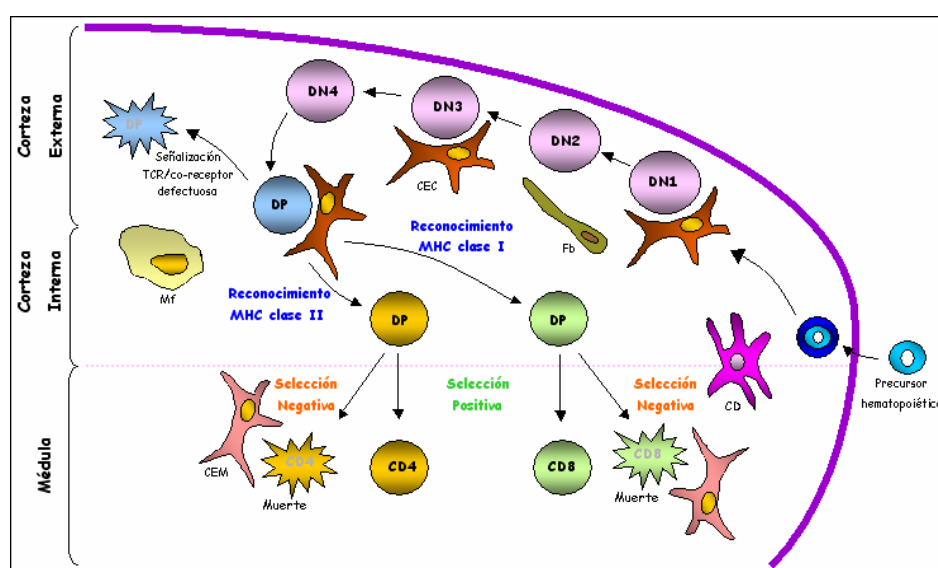


Figura 5. Esquema del proceso de maduración de los timocitos en el timo. El programa de diferenciación de los timocitos comienza cuando las células precursoras entran en el órgano a través de los vasos sanguíneos situados en la zona de transición corteza-médula. En su paso a través de la corteza y hasta la médula, los timocitos interactúan con las células estromáticas que determinan el paso de un estadio de maduración al siguiente. DN: dobles negativos; DP: dobles positivos; CEC: Células Epiteliales Corticales; Fb: Fibroblastos; Mf: Macrófagos; CEM: Células Epiteliales Medulares.

La diferenciación de los timocitos es necesaria para que células inmaduras se especialicen en el reconocimiento de las moléculas propias del organismo y reaccionen ante otras extrañas que puedan constituir una amenaza. La maduración comienza cuando los precursores hematopoiéticos migran desde la médula ósea y entran en el timo (atraídos mediante procesos quimiotácticos), a través de los vasos sanguíneos en la zona de unión cortico-medular. A partir de este momento, su paso desde las regiones más periféricas de la corteza hasta la zona medular implica interacciones con las

diferentes células estromáticas, que determinan la transición de un estadio de maduración al siguiente [7]. El resultado de este delicado programa es la salida hacia los compartimentos linfáticos periféricos, únicamente de los timocitos competentes con fenotipos maduros [8] (**Figura 5**).

La expresión de marcadores de membrana específicos, principalmente los co-receptores *CD4* y *CD8*, permite definir distintas poblaciones de timocitos según su estadio de maduración en ratón (existen algunas diferencias entre humano y ratón) (**Figura 6**):

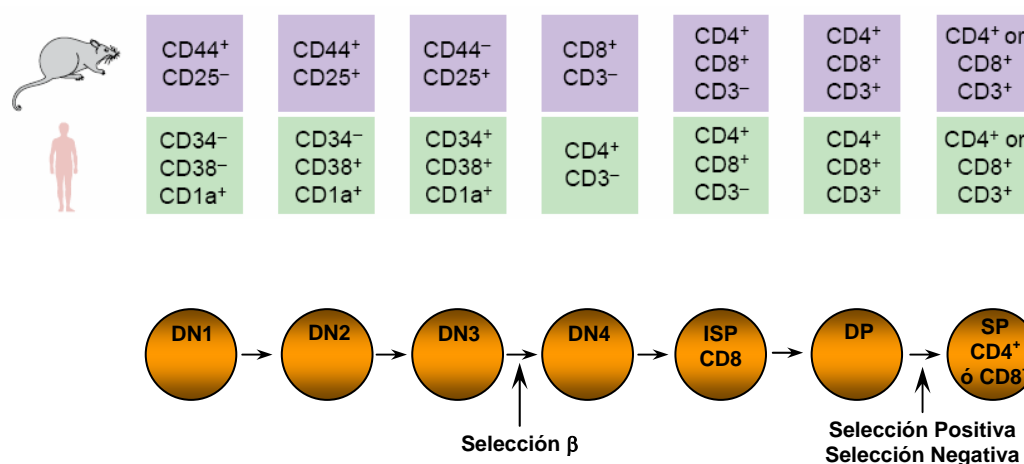


Figura 6. Esquema de marcadores de células T en ratones y el ser humano. Se indican los principales puntos de control en el desarrollo de timocitos de ratón.

Modificado a partir de (Weerkamp et al, 2006).

- *población doble negativa (DN)*, cuando no se expresan los marcadores *CD4* y *CD8*, representa el estadio de mayor inmadurez. Esta población se puede subdividir a su vez en *DN1*, *DN2*, *DN3* y *DN4*, según presencia/ausencia de los marcadores *CD44* y *CD25*: *CD44⁺CD25⁻*, *CD44⁺CD25⁺*, *CD44⁻CD25⁺* y *CD44⁻CD25⁻* respectivamente.
- *población simple positiva CD8⁺ inmadura (SPI CD8⁺)*, cuando las células pasan de *DN* a *DP* expresan primero el marcador *CD8*, que define este estadio de

transición.

- *población doble positiva (DP)*, cuando se localizan en la superficie celular *CD4* y *CD8*.
- *población simple positiva $CD4^+$ (SP $CD4^+$)*, cuando las células expresan *CD4*.
- *población simple positiva $CD8^+$ (SP $CD8^+$)*, cuando las células expresan *CD8*.

De hecho, la expresión de los marcadores *CD4* y *CD8* está determinada por la expresión de un complejo denominado *TCR* por sus siglas en inglés (*T cell receptor*), característico y exclusivo de los linfocitos T [9]. El complejo *TCR*, implicado en el reconocimiento de moléculas diversas que permite al linfocito reaccionar frente a antígenos extraños, está formado mayoritariamente por las cadenas *TCR α* y *TCR β* que se expresan en distintos momentos del programa de desarrollo de los timocitos y marcan puntos de control del mismo. Así, la **selección β** se da en el paso de *DN3* a *DN4*, cuando la expresión del complejo pre-*TCR*, formado por una cadena *TCR β* productiva unida a una cadena denominada pre-*TCR α* no productiva y asociado al complejo *CD3*, induce la proliferación de estas células. La expresión de este complejo induce, a su vez la expresión de los marcadores *CD4* y *CD8*. Finalmente, cuando se expresa el complejo *TCR $\alpha\beta$* (cadena *TCR α* productiva asociada con una *TCR β* ya seleccionada) en la población *DP*, se dan los procesos de **selección negativa y positiva** que dependen de las interacciones de estos timocitos con las células epiteliales estromáticas. De este modo, las células cuyo *TCR* reconoce el *MHC* (de sus siglas en inglés *major histocompatibility complex*) propio con alta afinidad se eliminan mediante apoptosis (selección negativa), mientras las células con receptores que reconocen el *MHC* con afinidad intermedia son rescatadas de la apoptosis (selección positiva), y se diferencian como *SP $CD4^+$* si han reconocido un *MHC* de tipo II o como *SP $CD8^+$* si el reconocimiento ha sido de un *MHC* de tipo I.

3.2. Vías de señalización implicadas

En el timo conviven procesos como la diferenciación de células inmaduras, el mantenimiento de poblaciones de células troncales, la proliferación de poblaciones seleccionadas y la apoptosis. Tales eventos están gobernados por diferentes vías de señalización, entre las que se encuentran tres específicas y altamente conservadas: la vía de Notch, la de Hedgehog y la de Wnt.

3.2.1. La vía de Notch

Las células troncales hematopoiéticas (*HSCs*, de las siglas en inglés *hematopoietic stem cells*) podrían estar ya comprometidas con el linaje de células T antes de llegar al timo (*ETPs*, de las siglas en inglés *early thymocyte progenitors*). Una vez allí, la señalización de Notch, con la intervención específica de Notch1, permite que la diferenciación de células T culmine al mismo tiempo que se inhibe el desarrollo de células B [10]. De hecho nuestro equipo ha demostrado que la sobre-expresión de *Notch1* está relacionada con el desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación γ [11].

3.2.2. La vía de Hedgehog

Las células *ETPs* deben proliferar antes de seguir el programa de maduración, para poder generar los 100-200 millones de timocitos que caracterizan un timo adulto de ratón [12], pues al entrar en el timo su número es muy reducido: se calcula que entra una sola célula al día [13]; además, en determinados puntos de control esenciales como la selección β también es necesario que se den eventos de división celular. Parece que las rutas de Hedgehog y Wnt proporcionan las señales proliferativas necesarias.

En cuanto a la vía de Hedgehog, la familia de proteínas Hedgehog (Hh) está formada por tres miembros: *Sonic-Hh (Shh)*, *Indian-Hh (Ihh)* y *Desert-Hh* que disparan

esta vía al unirse a su receptor de membrana *Patched* (*Ptc*). Es entonces cuando la molécula *Smoothened* (*Smo*), también localizada en la superficie celular, transmite la señal al interior celular y los factores de transcripción de la familia Gli (*Gli1*, *Gli2* y *Gli3*) activan y regulan la transcripción de los genes diana necesarios (**Figura 7**).

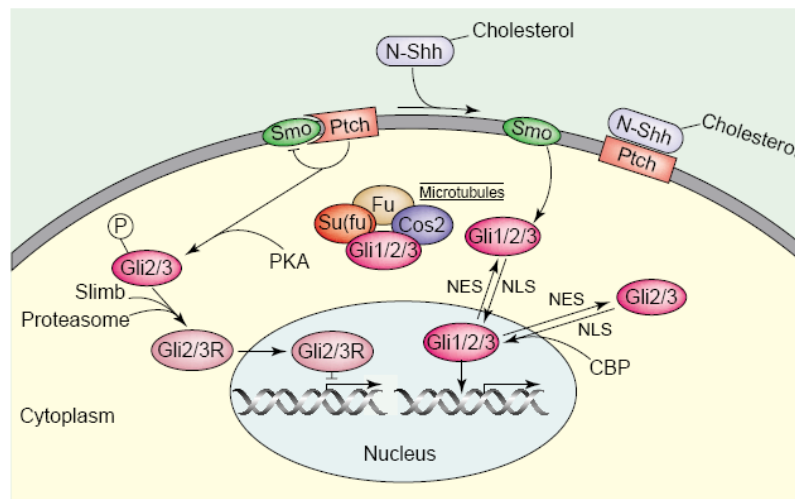


Figura 7. Vía Hh. En ausencia de su ligando, Ptc inhibe la capacidad de Smo de transducir la señal. Sin embargo, cuando el ligando Shh se une al receptor los factores de transcripción Gli son activados a través de Smo.

(Varas et al, 2006).

En el timo, se sabe que la proteína Shh es producida por el epitelio tímico, mientras que Ihh se asocia con los vasos sanguíneos de la médula. Por otro lado, el gen *Smo*, que se expresa en *ETPs*, tiene sus niveles de expresión restringidos a los timocitos *DN*, siendo las *DN2* las que lo expresan en mayor cantidad, disminuyendo gradualmente en *DN3* y *DN4* hasta ser casi inapreciable en *DP* (**Figura 10**). La ausencia de Smo implica atrofia tímica, debida a la disminución de las poblaciones *DN* y *DP*, por tanto la función del producto de este gen es fundamental para la proliferación de los timocitos. *Ptc*, *Gli1* y *Gli2* siguen un patrón de expresión parecido al de *Smo*, sugiriendo que la señalización de Hh es esencial desde el estadio de *ETPs* hasta el estadio *DN2* [14].

3.2.3. La vía de Wnt

Las vías de señalización de WNT proporcionan señales proliferativas para la mayoría de las células inmaduras progenitoras en los linajes T, B y de auto-renovación para las Células Troncales Hematopoyéticas (HSCs).

En los mamíferos se han descrito unas 20 glicoproteínas Wnt agrupadas en 12 subfamilias. Al unirse a su receptor Frizzled (Fz), localizado junto con su co-receptor *LPR* (de las siglas en inglés *lipoprotein receptor-related proteins*), puede activar tres vías diferentes de señalización: la canónica (vía Wnt/ β -catenina), la no canónica Wnt/ Ca^{2+} y la no canónica *PCP* (de las siglas en inglés *planar cell polarity*) [15]. Únicamente se ha prestado atención a la vía canónica por ser la que mayor implicación tiene en el sistema hematopoiético.

Brevemente, cuando se une un ligando Wnt al complejo receptor se activa la proteína citoplasmática Dishevelled (Dsh) que inhibe a la quinasa glicógeno sintasa *GSK3 β* (de sus siglas en inglés *glycogen synthase kinase*) y, por tanto, también inhibe el marcaje mediante fosforilación de la β -catenina para su degradación. Esta proteína se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde se une a factores de transcripción como TCF (de sus siglas en inglés *T cell factor*) o LEF (de sus siglas en inglés *lymphocyte-enhancer-binding factor*) y promueve la expresión de genes implicados en proliferación, desarrollo o diferenciación (**Figura 8**).

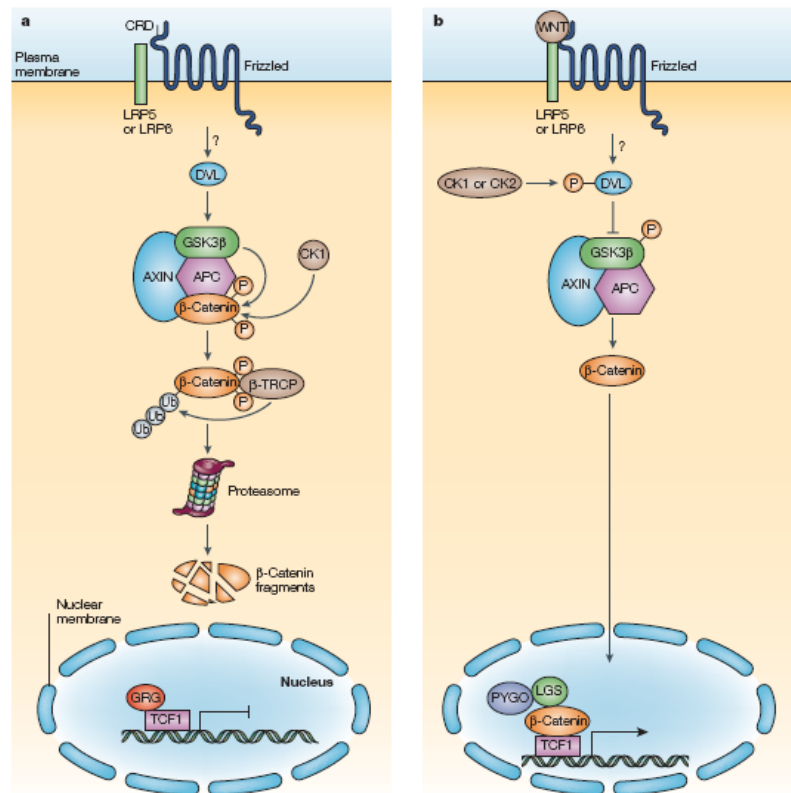


Figura 8. Vía Canónica de Wnt. (a) En ausencia de señales Wnt, GSK3 β interacciona con los productos de los genes Apc y con una molécula denominada Axin, formando el complejo de degradación que media la fosforilación de la β -catenina, junto con la proteína CK1. La β -catenina fosforilada es reconocida por otra proteína y pasa a ser ubiquitinizada y posteriormente degradada en el proteosoma. En el núcleo, los factores de transcripción de unión a ADN que son dianas de β -catenina, están unidos a represores como Groucho (GRG) que les impiden ejecutar su función. (b) Cuando el ligando Wnt activa la vía, la β -catenina es capaz de pasar al núcleo y unirse a los factores que activan la transcripción de determinados genes.

(Staal&Clevers, 2005).

En el timo, se ha demostrado la expresión de Wnt1, Wnt3, Wnt4, Wnt5b y Wnt10b en timocitos inmaduros, comportándose como factores de crecimiento en los timocitos *DN* WNT1 y WNT4 [16, 17]; pero parece que la fuente principal de proteínas WNT son las células epiteliales del estroma (**Figura 10**) [18], [19].

Respecto del papel desempeñado en el desarrollo de células T por la β -catenina existe controversia: en algunos casos la ausencia de esta proteína no impide el desarrollo de *SP*, pero sí influye en la disminución de la celularidad [20], [21] y en otros casos se detiene el desarrollo de células T [22].

En cuanto a los factores de transcripción, Tcf1 parece esencial para las primeras etapas del desarrollo de los timocitos, mientras que Lef1 parece estar más implicado en el desarrollo de células B. Los ratones deficientes en TCF1 muestran una disminución en el número de timocitos *DN* y un bloqueo en la transición *DN-ISP* [18], lo que sugiere que la vía de Wnt, al igual que la de Hedghog, controla esencialmente los índices de celularidad en el timo (aunque no se podría descartar de forma absoluta su participación en algunas etapas del proceso de diferenciación de los timocitos).

3.2.4. El papel de las uniones adherentes

Además de su participación esencial en la vía canónica de señalización de Wnt, la β -catenina puede desempeñar un importante papel como componente de las Uniones Adherentes entre células epiteliales, al unirse al extremo carboxilo de caderinas clásicas (E, la más estudiada, N, P, R y VE) (**Figura 9**).

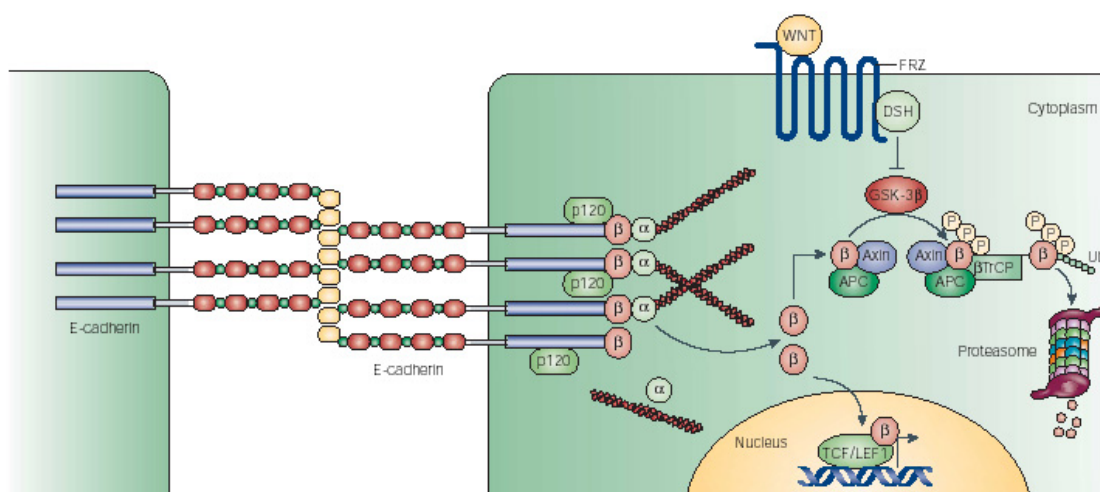


Figura 9. Esquema de los dos conjuntos de β -actina disponibles en la célula. Parece que las moléculas de β -actina recién sintetizadas saturan primero la fracción de proteína que forma parte de las uniones adherentes. El exceso de β -actina citoplasmática libre sería degradado por el complejo de degradación o pasaría al núcleo para activar a factores de transcripción específicos al activarse la vía canónica de Wnt. (Cavallaro&Christofori, 2004).

Se ha descrito la expresión de E-caderina en las células epiteliales del estroma tímico y en timocitos inmaduros *DN*, específicamente en estadio *DN3* (**Figura 10**) [23]. Si se interrumpen las interacciones homotípicas entre E-caderinas, se produce una disminución en el número de células *DP* con un incremento en el de *DN* [24].

Si hay cambios en los niveles de expresión de caderinas en el timo de nuestros ratones, se podría ver afectada a la cantidad de β -catenina libre en el citoplasma, ya que las moléculas de β -catenina recién sintetizadas saturarían primero el “pool” que forma parte de las Uniones Adherentes (que nunca sería utilizado en la vía de señalización), mientras el exceso de proteína libre en el citoplasma sería degradado por el complejo APC o salvado de su degradación por la activación de la vía canónica de señalización Wnt con las correspondientes consecuencias en el control de los procesos de proliferación de los timocitos inmaduros [25].

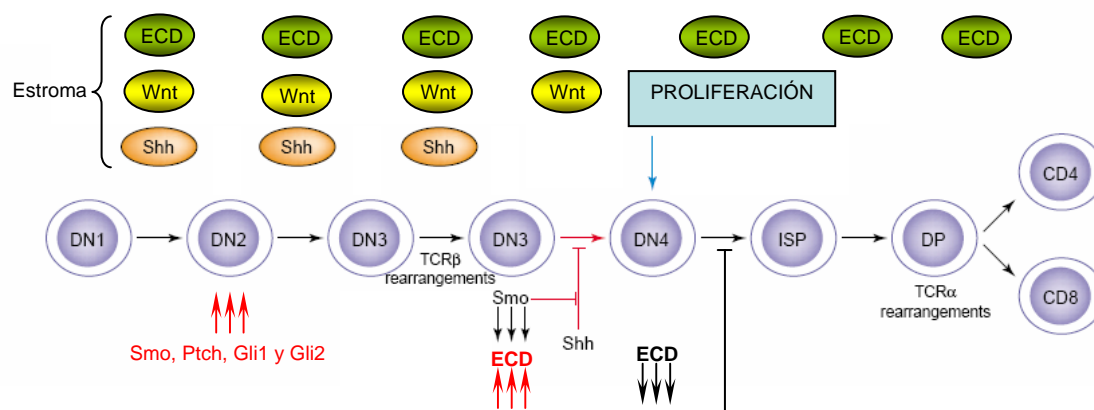


Figura 10. Esquema de la expresión de algunas moléculas de las vías de Hh y Wnt en el timo de ratón. Los ligandos de ambas rutas, junto con la E-caderina son expresados por células epiteliales del estroma tímico. Los estudios de expresión realizados demuestran que los niveles más altos de expresión de Smo, Ptc, Gli1 y Gli2 aparecen en DN2 y empiezan a decaer en DN3. Los timocitos DN expresan E-caderina, cuyos niveles de expresión mayores se encuentran en DN3.

Modificado a partir de (Varas et al, 2006).

4. Alteraciones génicas en linfomas tímicos de ratón

Nuestro equipo ha demostrado alteraciones específicas en los genes *p15/INK4b*, *p16/INK4a*, *p73*, *Pten*, *Fas/Cd95*, *c-Myc*, *Notch1*, *Notch2* e *Ikaros* en una fracción muy significativa de los tumores [11, 26-31]. Recientemente hemos encontrado evidencias del papel oncogénico de p21 en este tipo de linfomas [32].

El proto-oncogen *c-Myc* (junto con *Wnt1*) se localiza en el cromosoma 15 de ratón, cuya trisomía se ha descrito como un hecho frecuente y característico en estos tumores [33]. Además, al igual que *ciclina D1*, *c-Myc* es uno de los genes diana de la vía de señalización de Wnt [30], [99].

Sin embargo, a pesar de las implicaciones comentadas de las vías de Wnt y de Hedgehog en los procesos de diferenciación, supervivencia y proliferación de los timocitos, no se han descrito hasta la fecha alteraciones en ninguno de los componentes de estas vías en los linfomas linfoblásticos. Tampoco se sabe nada sobre el papel de las caderinas clásicas aunque, como se ha comentado, todos aquellos procesos dependen en gran medida de las interacciones entre timocitos y células estromáticas para crear un micro-ambiente adecuado.

En esta tesis se han abordado estos aspectos, poniéndose de manifiesto el silenciamiento epigenético de las proteínas de adhesión caderinas E y N, y describiéndose alteraciones significativas en algunos componentes de las vías de Hedgehog y Wnt.

OBJETIVOS

Los linfomas tímicos inducidos en cepas susceptibles de ratón con radiaciones ionizantes constituyen un grupo heterogéneo de linfomas T, caracterizados por la acumulación de timocitos inmaduros en el espacio intratímico. Nuestro equipo ha estudiado en los últimos años una amplia colección de este tipo de linfomas, inducidos en cepas susceptibles de ratón, demostrando numerosas alteraciones génicas implicadas en la proliferación de timocitos de los que se desconocía su estadio de maduración. Como se ha comentado, las vías de Notch, Wnt y Hedghog son vías de señalización altamente conservadas a lo largo de la evolución, implicadas en el control de la supervivencia, proliferación y diferenciación de los timocitos. Nuestro equipo ha demostrado ya, entre otras, alteraciones en la vía de Notch y ha descrito la sobre-expresión frecuente del oncogen *c-Myc* [11] que, junto con el locus de *Wnt1*, se localiza en el cromosoma 15, cuya trisomía es un hecho frecuente en este tipo de tumores.

Por tanto, los objetivos principales de esta tesis han sido:

1. El análisis histológico y citológico de muestras de timos de ratones no tratados y de muestras obtenidas mediante distintos tratamientos específicos con radiación- γ , para determinar el estadio de maduración de los timocitos tumorales y para demostrar nuevas alteraciones fenotípicas.
2. El análisis de los patrones de expresión de los genes que codifican para las caderinas clásicas E y N, para determinar su posible implicación en el desarrollo de estos tumores.
3. El análisis comparativo de los perfiles de expresión de genes que definen las vías de señalización de Wnt y de Hedgehog en fracciones celulares separadas (células estromáticas y timocitos), para poner de manifiesto nuevos cambios significativos en alguno de esos componentes, valorando la importancia del microambiente tímico en este tipo de linfomas.

RESULTADOS

Objetivo 1

Análisis histológico y citológico de muestras obtenidas
tras tratamientos con radiación y específicos

1. 1. Clasificación de muestras: modelo animal y tratamientos

El análisis genético de cualquier proceso cancerígeno en la especie humana cuenta con la imposibilidad de controlar todas las variables que influyen en su origen y desarrollo. Por ello, los modelos animales (especialmente los desarrollados en el ratón) constituyen una herramienta necesaria para este tipo de estudio [100]. Entre sus numerosas ventajas destacan las posibilidades de:

- a) reducir la variabilidad entre individuos gracias a la generación de animales genéticamente idénticos, que conforman las denominadas cepas consanguíneas o *inbred*
- b) generar neoplasias concretas en un elevado número de individuos de forma relativamente fácil y rápida, debido a la existencia de protocolos específicos de inducción de tumores, a que son animales de pequeño tamaño, y a que tienen camadas numerosas y periodos de gestación (21 días) y vida (2-3 años) cortos.
- c) conocer la función y la importancia de genes concretos en distintos procesos, desde el desarrollo embrionario hasta la tumorigénesis, gracias al conocimiento de su genoma y a la disponibilidad de embriones, líneas celulares derivadas y ratones genéticamente manipulados.
- d) extrapolar los resultados obtenidos en el modelo a la especie humana por la existencia de mapas de ortología.

En este estudio se han utilizado ratones pertenecientes a las cepas consanguíneas C57BL/6J y BALB/cJ ya que, además de lo anteriormente expuesto, muestran una alta susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación γ [34, 35].

La radiación γ es un agente físico de alto potencial mutagénico. Se trata de un tipo de radiación electromagnética que puede ser producida por isótopos inestables radiactivos como el ^{137}Cs . Al desintegrarse, estos compuestos liberan la energía suficiente como para eliminar completamente un electrón de la órbita de un átomo o

molécula (ionizarlo), rompiendo enlaces atómicos [101]. Por tanto, la radiación γ es capaz de inducir cambios físicos-químicos en las células que provocan una amplia gama de efectos a corto o a largo plazo. Como ejemplos del primer caso se incluirían la generación de roturas o formación de enlaces covalentes entre nucleótidos de las cadenas de *ADN*; y del segundo, alteraciones de tipo epigenético y de comunicación celular [36], inestabilidad genómica de las células descendientes de las irradiadas o muerte celular [37], que sucederían por la acumulación de radicales libres reactivos. De un modo u otro, la pérdida de información genética, la generación de mutaciones génicas y cromosómicas, la alteración de procesos de reparación, replicación y expresión conducen a un desarrollo celular anormal y eventualmente a la formación de tumores.

Los tratamientos administrados a ratones de las cepas susceptibles anteriormente mencionadas, basados en la aplicación de diferentes dosis de radiación y periodos de latencia optimizados, resultan en fenotipos distintos y clasificables (**Tabla 1**). La administración de 7 Gy de radiación en dosis semanales de 1,75 Gy conlleva el desarrollo de linfomas tímicos (LT) dentro de un periodo de latencia de 13 a 25 semanas en una alta fracción de ratones tratados [38]. La incidencia de este tipo de tumores en individuos de la cepa C57BL/6J es de un 73,4% [39], y en los híbridos F1 (C57BL/6J x BALB/c) de un 68,85%, según los últimos datos obtenidos en nuestro laboratorio. Sin embargo, también hay un porcentaje de animales que no desarrollan tumores a pesar de sufrir este tratamiento específico (No LT).

Los criterios utilizados para la identificación de los linfomas tímicos se basaron inicialmente en la determinación del peso del timo. De este modo, tomando como referencia investigaciones anteriores [38], se consideraron LT todas las muestras con un peso superior a 100 mg. Por otro lado, se agruparon como No LT todas aquellas muestras cuyo peso fuese siempre inferior a 72 mg, ya que éste fue el peso máximo del timo alcanzado por ratones de 36 semanas que no fueron sometidos a tratamiento con

Tratamiento	†	Fenotipo	N	PTmín – max	PT medio
Sin tratamiento	-	Ctrl*	21	64,7 - 86,4 mg	75,22 mg ± 6,8623
1,75 Gy (x4)	13-25 sem	LT	65	120 - 1664 mg	543 mg ± 342,3537
	25 sem	No LT	33	0 - 72 mg	36,06 mg ± 16,9539
1,75 Gy (x1)	24 h	DU	20	10,8 - 66,2 mg	35,36 mg ± 13,0586

Tabla I. Grupos muestrales según tratamiento administrado y presencia/ausencia de linfoma tímico. Ctrl*, grupo control formado por individuos de 4-5 semanas de edad no irradiados. LT, individuos que generaron linfoma tímico, entre las semanas 13 y 25 del periodo de latencia (†), tras recibir cuatro dosis de 1,75 Gy. No LT, animales que no desarrollaron linfomas tímicos tras un tratamiento similar al del grupo con fenotipo LT, en un periodo de latencia de 25 semanas. DU, ratones sometidos a una única dosis de irradiación de 1,75 Gy y sacrificados tras 24 horas. N, número de animales analizados. PT mín - máx, valores mínimo y máximo de pesos de timos. PT medio, promedio de pesos tímicos.

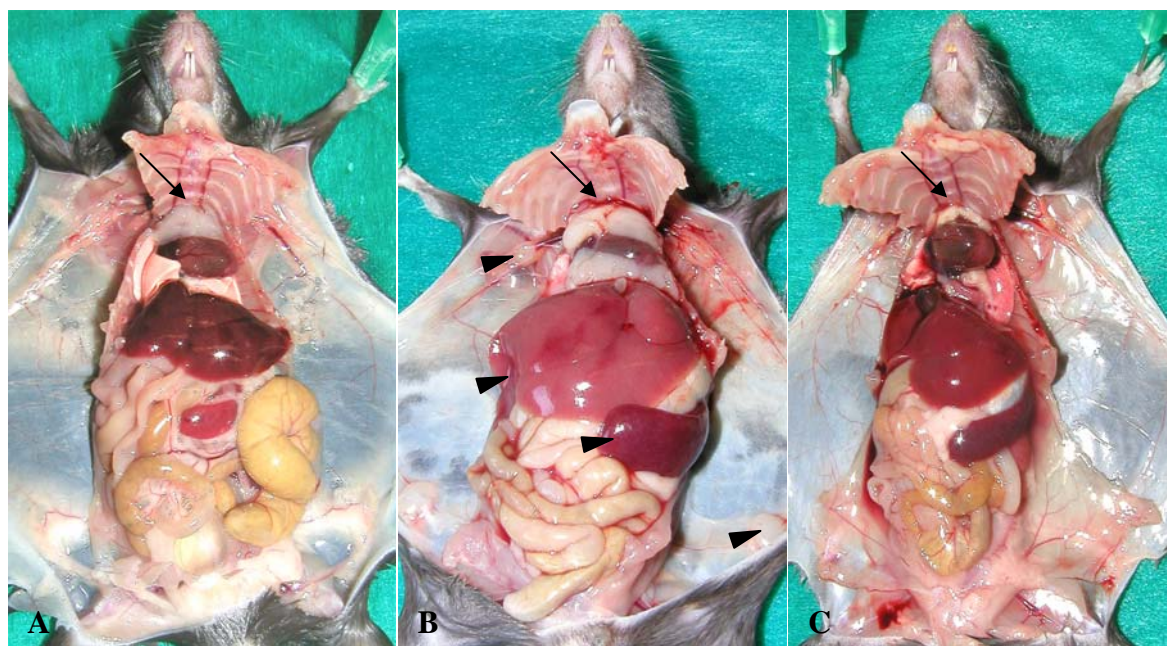


Figura R1-1. Anatomía de individuos representativos de cada grupo muestral. A, Individuo control. B, Individuo con linfoma tímico y diversos órganos afectados (hepatomegalia, esplenomegalia y adenopatía, **cabezas de flecha**). C, Individuo representativo del grupo que no desarrolló linfoma pasadas 25 semanas tras tratamiento de dosis sucesivas y de animales tratados con dosis única. El timo (**flechas**) de animales con linfoma tímico es mayor que el de ratones control, mientras que los ratones tratados, tanto con dosis fraccionada que no desarrollaron linfoma como con dosis única, presentan una disminución de la glándula.

dosis fraccionadas de radiación.

Para evaluar el efecto a corto plazo de la radiación se analizó el timo de ratones que fueron sometidos a una única dosis de 1,75 Gy y se sacrificaron 24 horas después (DU).

Otra fracción de individuos de cuatro semanas que no fueron tratados se utilizaron como controles (Ctrl).

Las necropsias realizadas de modo rutinario en todos los ratones evidenciaron que el agrandamiento del timo en los linfomas (peso medio de $543 \text{ mg} \pm 342,3537$) solía presentarse acompañado por hepatomegalia, esplenomegalia, adenopatías (ganglios linfáticos hipertrofiados) y /o infiltraciones renales (**Figura R1-1B**). Por el contrario, tanto los individuos que no desarrollaron linfoma tímico tras aplicación de dosis fraccionadas de radiación, como los tratados con dosis única (**Figura R1-1C**), tenían un aspecto muy parecido al de los controles (**Figura R1-1A**) pero presentan como diferencia más llamativa la disminución del peso medio del timo ($36,06 \text{ mg} \pm 16,9539$ y $35,36 \text{ mg} \pm 13,0586$, en cada caso) respecto del grupo control ($75,22 \text{ mg} \pm 6,8623$) (regresión tímica).

1.2. Análisis Histológico

1.2.1. Alteraciones morfológicas generales

El análisis histológico se realizó en secciones teñidas con Hematoxilina&Eosina, pertenecientes a timos completos de un mínimo de tres individuos en cada uno de los grupos.

En las muestras de ratones control (**Figura R1-2A**) se apreció una buena demarcación cortico-medular, con zonas bien definidas de corteza y médula. En la periferia los timocitos son más numerosos y están densamente empaquetados, lo que contribuye a la intensa basofilia en esta región. En el centro de los lobulillos los

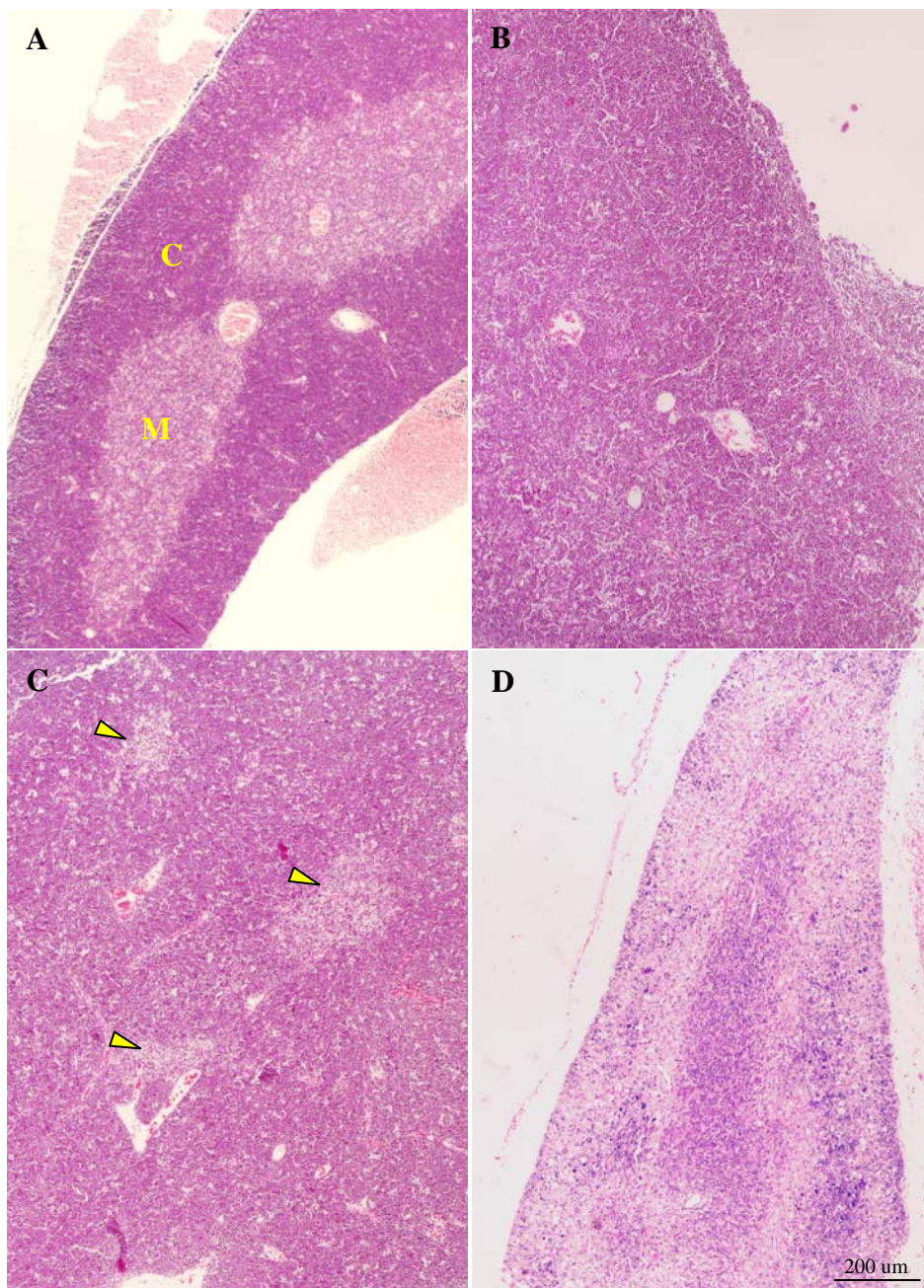


Figura R1-2. Secciones histológicas representativas de cada grupo de muestras. A, Timo control (procedente de un ratón no irradiado) con estructura típica del órgano. **B,** LT con alto grado de desorganización **C,** No LT con zonas menos intensamente teñidas (**flechas**) que se corresponden con regiones similares a la médula del timo de individuos control. **D,** DU con patrón de tinción inverso respecto del control.

timocitos son más escasos y las células epiteliales con abundante citoplasma eosinófilo son más prominentes, lo que implica una tinción más tenue.

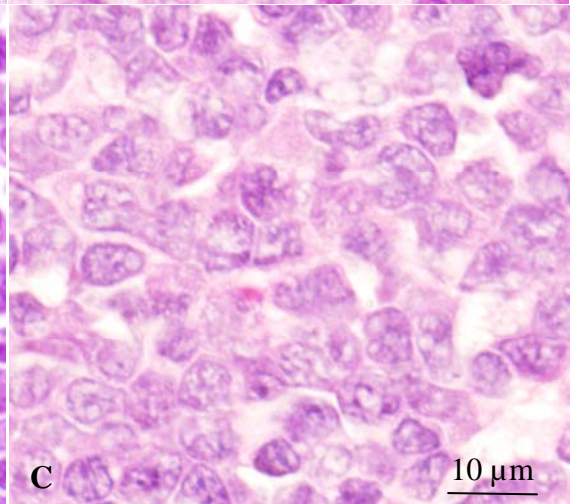
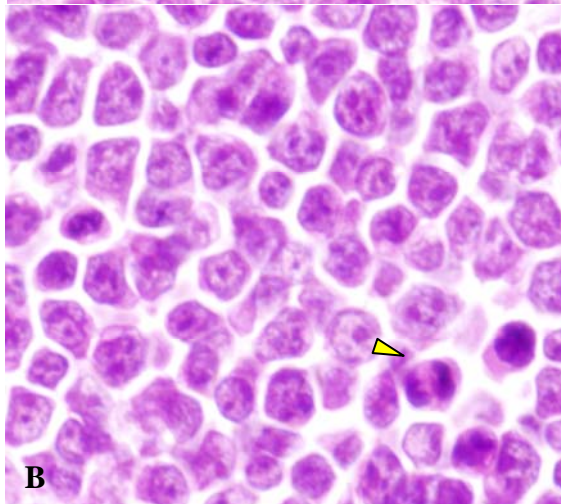
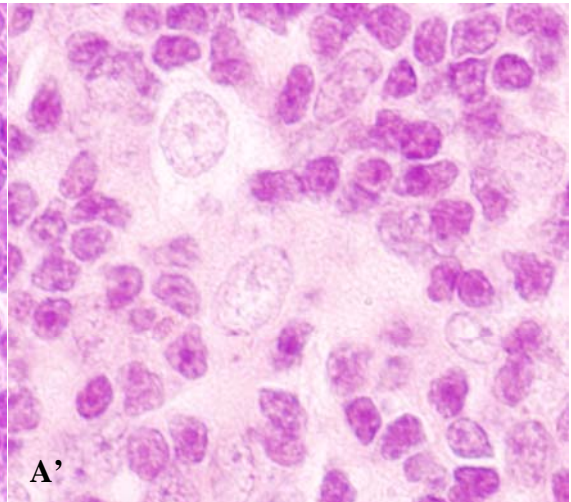
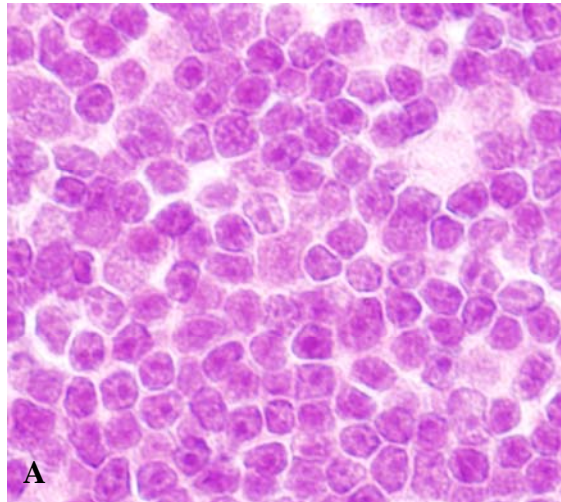
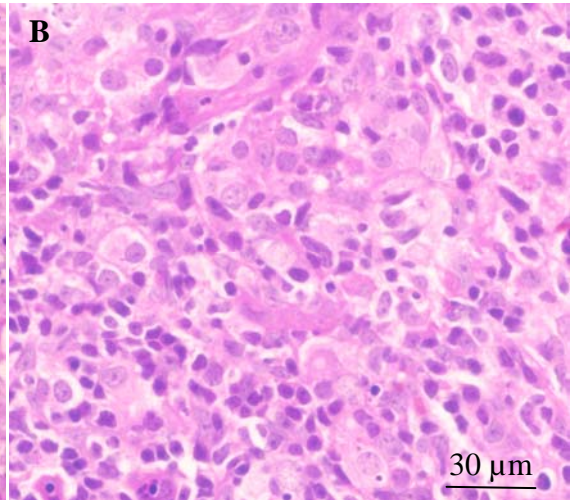
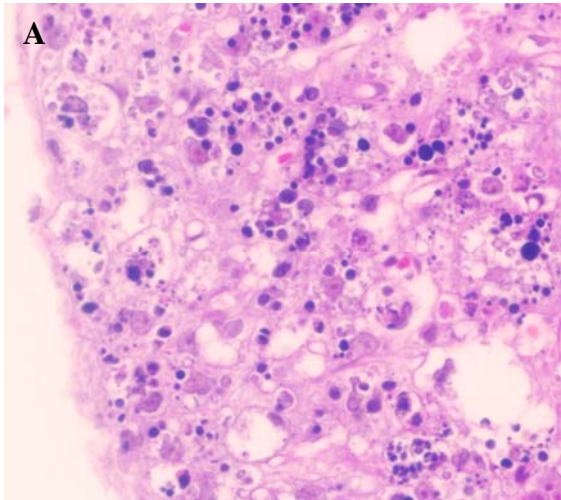
Tanto los linfomas tímicos (**Figura R1-2B**) como los timos de individuos sometidos al mismo tratamiento que no desarrollaron este tipo de tumor (**Figura R1-2C**), presentaron una desorganización estructural llamativa con una mala diferenciación cortico-medular. En el caso de este último grupo, en algunas ocasiones se observaron acúmulos pálidos (flechas), con una tinción semejante a la de las zonas medulares de los timos control.

Al irradiar los ratones con una dosis única (**Figura R1-2D**) el patrón normal de corteza intensamente teñida y médula más pálida se invierte, debido a la muerte celular masiva por apoptosis, que resulta más evidente en zonas más periféricas, acompañada por falta de inflamación y disminución del tamaño de la glándula [40-42]. Como se muestra en la Figura 3, en la corteza (**Figura R1-3A**) es llamativa la disminución de la cantidad de timocitos y la presencia de estructuras esféricas intensamente teñidas dispersas por toda la zona, además de células estromáticas con una importante vacuolización del citoplasma. En la médula (**Figura R1-3B**), sin embargo, se aprecian ambos tipos celulares, siendo el grado de alteración de las células estromáticas menos evidente.

En los timos control, los timocitos más inmaduros se localizan en la corteza adoptando formas poliédricas debido al alto grado de compactación celular (**Figura R1-4A**), y los más diferenciados lo hacen entre las células estromáticas de la médula (**Figura R1-4A'**). Ambos tipos celulares son fácilmente distinguibles debido al tamaño menor de los timocitos, a su escaso citoplasma y a un núcleo más intensamente teñido. La pérdida de las zonas de corteza y médula observada en los linfomas inducidos por radiación, viene acompañada por la presencia de una población con características morfológicas propias de células indiferenciadas: tamaño grande, varios nucleolos prominentes y escaso citoplasma (**Figura R1-4B**).

Figura R1-3. Detalle de muestra de individuo sometido a dosis única de radiación de 1,75 Gy. A. Zona de corteza, en la que se aprecia una muerte celular masiva y una llamativa vacuolización de las células estromáticas. **B.** Zona de médula, significativamente menos dañada.

Figura R1-4. Análisis morfológico de muestras tratadas con dosis de radiación sucesivas. Timocitos localizados en la corteza (**A**) y células estromáticas y timocitos medulares (**A'**) pertenecientes a un timo de un individuo control. **B,** Células con características de linfoblastos de individuo con linfoma tímico. **Flecha,** mitosis. **C,** Células de individuo tratado sin linfoma. Los espacios intercelulares resultan muy llamativos en linfomas.



En las muestras correspondientes a individuos irradiados que no llegaron a desarrollar linfoma (**Figura R1-4C**) las células, que se encuentran distribuidas aleatoriamente, poseen núcleos grandes e irregulares, con cromatina muy laxa, rodeados de una cantidad de citoplasma mayor que la de los timocitos control, aunque menor que la del componente estromático de un timo control. En cualquier caso, su aspecto difiere del de cualquiera de las células que se observan en la situación normal. Para distinguir los tipos celulares concretos serían necesarios otro tipo de estudios basados en la utilización de marcadores celulares específicos.

En el caso del linfoma linfoblástico resulta especialmente llamativa la pérdida de contacto entre células que no ocurre en ninguna de las demás situaciones.

1.2.2. Análisis citológico mediante citometría de flujo

El análisis mediante citometría de flujo con los marcadores *CD4* y *CD8* de los timocitos tumorales (**Figura R1-5**) demostró la proliferación de células inmaduras en estadios de *DN*, *SPI* y en algunos casos *DP*.

Estos datos, junto con los rasgos fenotípicos característicos de células blastoides anteriormente descritos, permite clasificar a estos tumores como linfomas linfoblásticos de tipo T [38], [95]. Además se trata de tumores esencialmente monoclonales como se pudo comprobar analizando el tipo de reordenaciones TCR mediante *Sothorn-blot* (datos no mostrados).

1.2.3. Alteraciones morfológicas en células estromáticas

Aunque se pudiera pensar que al tratarse de linfomas linfoblásticos el efecto de la radiación solo afecta a la fracción linfocitaria, las alteraciones del componente estromático son también muy evidentes.

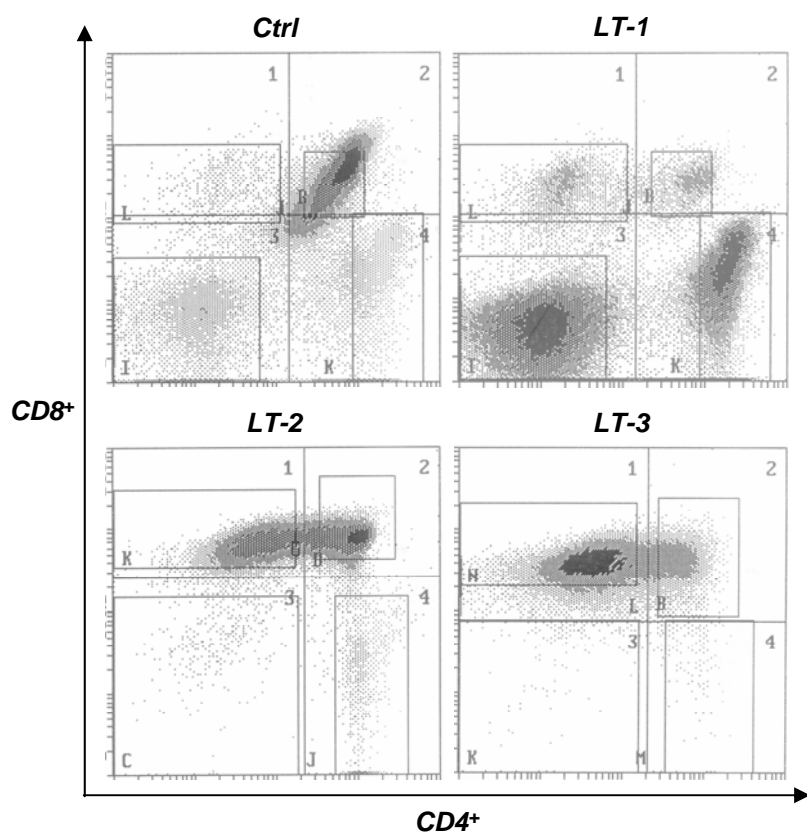


Figura R1-5. Análisis por citometría de flujo de muestras tumorales para los marcadores *CD4* y *CD8*. Los linfomas muestran aumento de las poblaciones de timocitos más inmaduros: *DN* (LT-1) y *DP-ISP CD8* (LT-2 y LT-3).

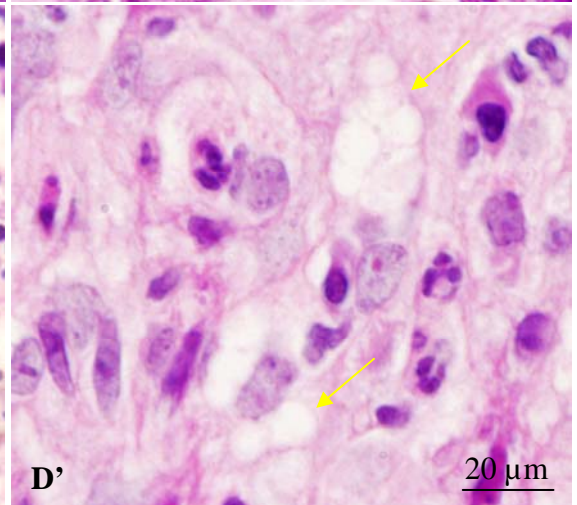
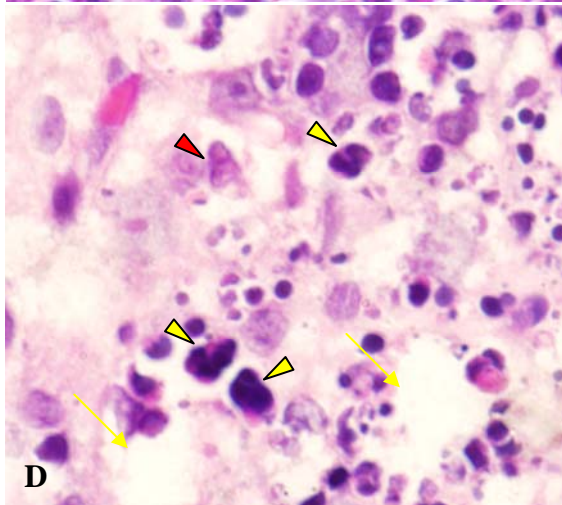
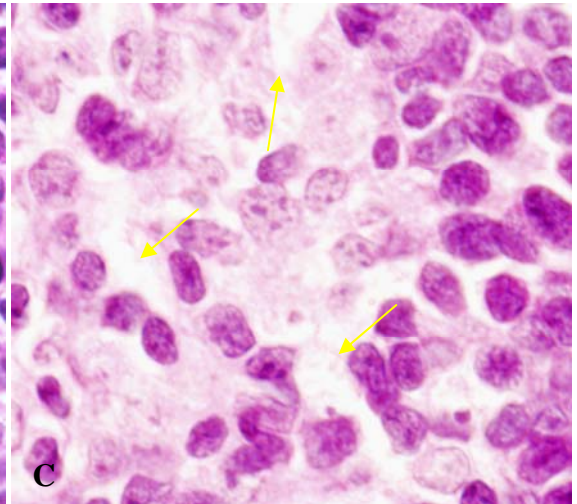
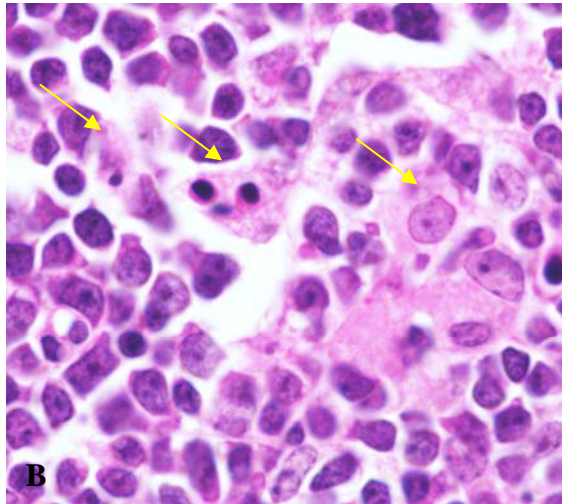
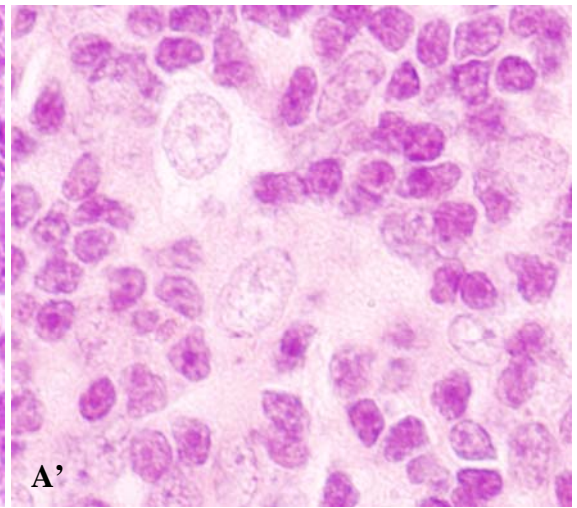
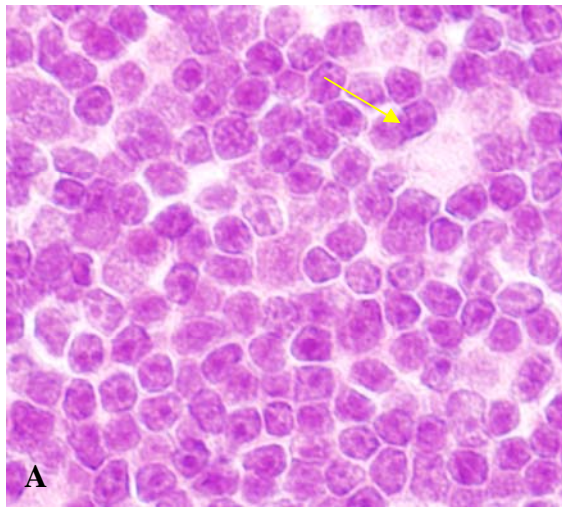
Mientras que en los timos control los timocitos se asientan entre células estromáticas, que adoptan formas estrelladas en la corteza (**Figura R1-6A; flecha**) y más redondeadas en la médula (**Figura R1-6A'**), en los linfomas tímicos existen pequeños agrupamientos de estas células distribuidos al azar que muestran lesiones llamativas como la pérdida de adhesión con células vecinas, reducción del volumen celular, condensación del citoplasma que se torna más eosinófilo, disminución del tamaño del núcleo acompañado por condensación de la cromatina (picnosis) y aparición de vesículas intensamente teñidas (**Figura R1-6B; flechas**)

En los individuos tratados con cuatro dosis de 1,75 Gy que no llegaron a desarrollar linfoma, además de células con características semejantes a las descritas anteriormente, se observó un componente estromático con un aspecto más parecido al de individuos control. También se apreciaron ciertas modificaciones sutiles como disminución del tamaño nuclear y vacuolización citoplasmática (**Figura R1-6C**).

En el caso de individuos tratados con dosis única de radiación, las células estromáticas tanto de la corteza (**Figura R1-6D**) como de la médula (**Figura R1-6D'**), presentaban una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma (**flechas**) siendo más importante el tamaño de las mismas en las células corticales, que en estudios anteriores se han asociado a una intensa actividad metabólica [43]. En algunos casos, se apreciaron más teñidas las zonas de contacto entre membranas plasmáticas de células adyacentes (**Figura R1-6D'**; véase también **Figura R1-3**). Así mismo, cabe destacar la presencia de cuerpos redondeados e intensamente teñidos agrupados sobre un fondo muy eosinófilo (**Figura R1-6D y D', cabezas flecha amarillas**).

Estos cambios morfológicos detectados en muestras LT y DU podrían estar en consonancia con la ejecución de un programa de suicidio celular o apoptosis [44, 45].

Figura R1-6. Análisis morfológico del componente estromático de muestras LT, No LT y DU. Timocitos (**A**) y células estromáticas (**A'**) de un individuo control. **B**, Detalle de grupo de células estromáticas entre timocitos de individuo con linfoma tímico. Las lesiones celulares son muy llamativas (flechas). **C**, Detalle de células estromáticas de un individuo tratado sin tumor con cierta vacuolización citoplasmática (flechas). **D**, Detalle de células estromáticas corticales y medulares (**D'**) de un individuo tratado con dosis alta de radiación. Vacuolas citoplasmáticas de gran tamaño (flechas) y alteraciones nucleares (cabeza de flecha roja). Cambios morfológicos y otras estructuras características de procesos de muerte (Cabezas de flecha amarillas).



1.3 Cuantificación de la apoptosis en fracciones celulares enriquecidas

Los procesos de apoptosis se han descrito como parte regular del programa de maduración de los timocitos [9, 46-48] y, por supuesto, están alterados durante el desarrollo de los linfomas tímicos ([32], [95]).

Para confirmar que las células estromáticas son capaces también de ejecutar sus propios programas de muerte celular, se aislaron las fracciones celulares estromáticas y de timocitos de muestras pertenecientes al grupo LT, y se estimó el grado de apoptosis mediante la inmunodetección de *PARP* (de sus siglas en inglés, *poly(ADP-ribose) polymerase*) proteolizado. Para determinar si hay diferencias cuantitativas, se calculó el cociente entre las cantidades de *PARP* proteolizado y de *PARP* total (estimadas mediante densitometría) en cada una de los tipos muestrales, comparando los resultados con los obtenidos en timos control. Los datos finales son la media de tres experimentos independientes (**Figura R1-7**).

Con respecto a las células estromáticas, dos de las muestras tumorales analizadas mostraron niveles de *PARP* parecidos a los de la muestra control (LT-1 y LT-2). El resto aumentaba desde valores de 2,20 hasta 6,30, es decir, el 67% de los linfomas mostraron niveles de apoptosis en sus células estromáticas entre dos y seis veces superiores a los detectados en timos controles.

En el caso de los timocitos, las muestras LT-2 y LT-5 mostraron niveles de *PARP* parecidos a los del control, y en el resto, los valores fluctúan entre valores 1,89 y 3,79 veces superiores a los detectados en las muestras control.

De acuerdo con estos resultados se podría afirmar que en los linfomas linfoblásticos hay un aumento significativo de la apoptosis tanto en los timocitos como en las células estromáticas y que, por tanto, la progresión de este tipo de tumores se sustenta esencialmente en la excesiva y descontrolada proliferación de los linfoblastos.

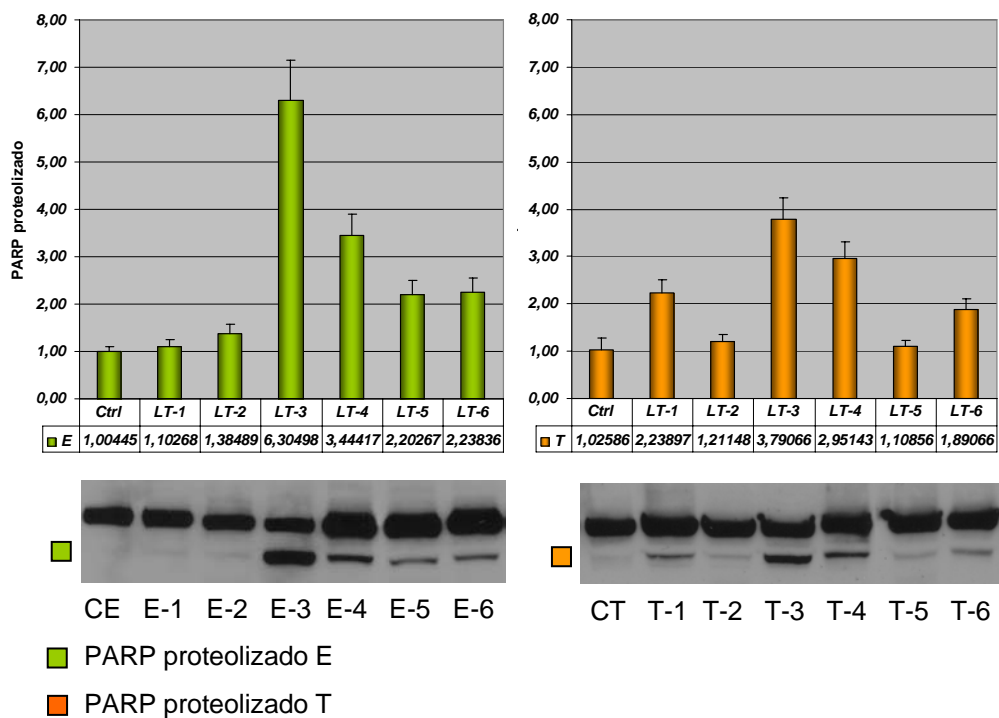


Figura R1-7. Apoptosis en fracción celular estromática (izda) y en timocitos (dcha). Existe apoptosis en ambas fracciones celulares

Los siguientes pasos en la investigación serán confirmar estos resultados preliminares mediante otra metodología que cuantifique las tasas de apoptosis en ambas fracciones celulares.

Objetivo 2

Estudio de los genes que codifican para las caderinas E y N implicadas en adhesión

2.1. Análisis de LOH y mutacional mediante SSCP

Debido a la llamativa pérdida de contacto entre células que se observó en los linfomas tímicos, el objetivo siguiente de esta tesis fue analizar el estatus de los genes que codifican para las dos caderinas más importantes implicadas en las uniones adherentes.

Puesto que los linfomas inducidos con radiación presentan frecuentes pérdidas de heterocigosidad, se analizó una muestra significativa de linfomas con marcadores polimórficos en torno a los loci de ambos genes. Aunque no se detectaron pérdidas significativas de ningún alelo de la caderina E, si se encontraron pérdidas significativas en el cromosoma 18 que sugerían una situación de hemigiosis para el gen de la caderina N en estos tumores [93] (**Figura R2-1**).

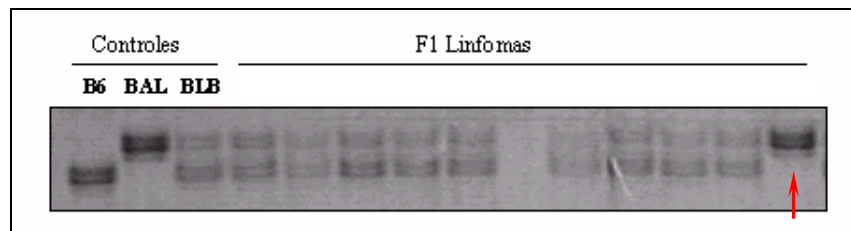


Figura R2-1. Análisis de detección de LOH en el cromosoma 18 con el marcador D18Mit21.
La última tumoral sólo conserva el alelo BAL.

La búsqueda de mutaciones en la secuencia codificante del gen *Cdh2* y en la región promotora del gen *Cdh1* mediante SSCP-secuenciación resultaron infructuosas (datos no mostrados).

2.2. Análisis de expresión

Dada la importancia de la pérdida de función de la caderina E en numerosos tipos de cánceres, incluidos cánceres hematológicos [49, 50] y la correlación entre ambos genes (bajada de caderina E y aumento de caderina N) en el proceso conocido como “*Cadherin Switch*” (Intercambio de Caderinas) descrito en las transiciones epitelio-mesénquima [51], el paso siguiente fue determinar los niveles de expresión transcripcional de ambos genes.

Los niveles de *ARN* se determinaron mediante *RT-PCR* cuantitativa en tiempo real en 14 linfomas tímicos derivados de ratones tratados con dosis de radiación sucesivas. Se tomó como unidad de referencia (valor=1) el nivel de *ARN* de los genes en timos sin tratar (Ctrl), y se compararon cantidades similares de *ARN* total de las diferentes muestras tumorales (200 ng). Los resultados finales son la media de los obtenidos en dos experimentos y tres series de valores tomados por cada experimento.

En el caso del gen *Cdh1* (*caderina E*) el 100% de los tumores mostraron niveles de *ARN* reducidos (valores entre 0,70 y 0,03) en comparación con los controles (valor 1 de referencia). En el caso de *Cdh2* (*caderina N*), fueron 13 de 14 tumores (92,85%) los que tenían una expresión del gen reducida y un único linfoma mostró expresión aumentada (7,15%). En todos los casos las diferencias fueron significativas ($P < 0,001$) (**Figura R2-2**).

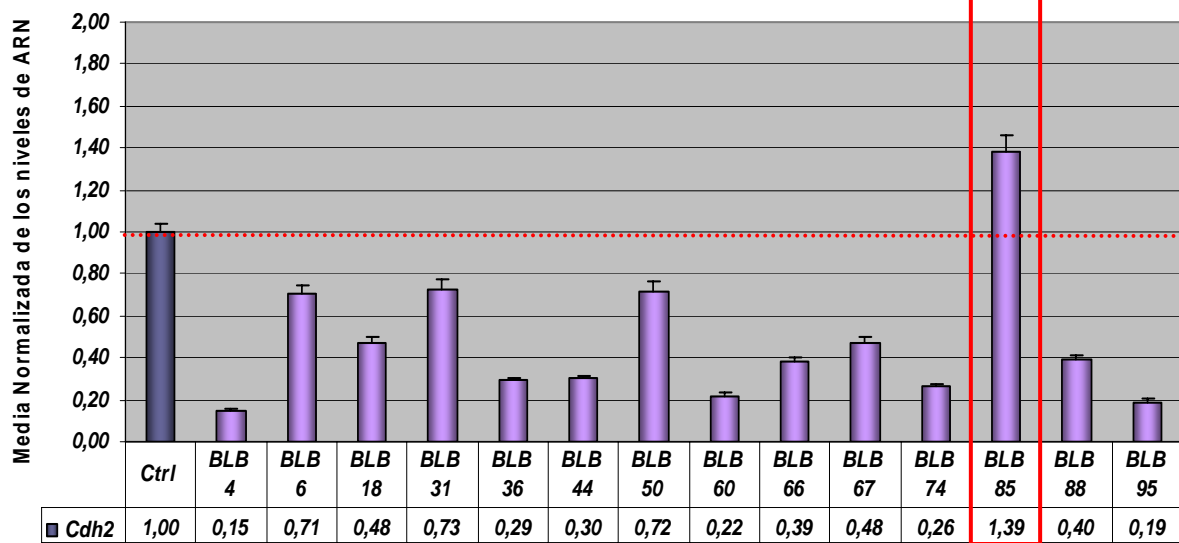
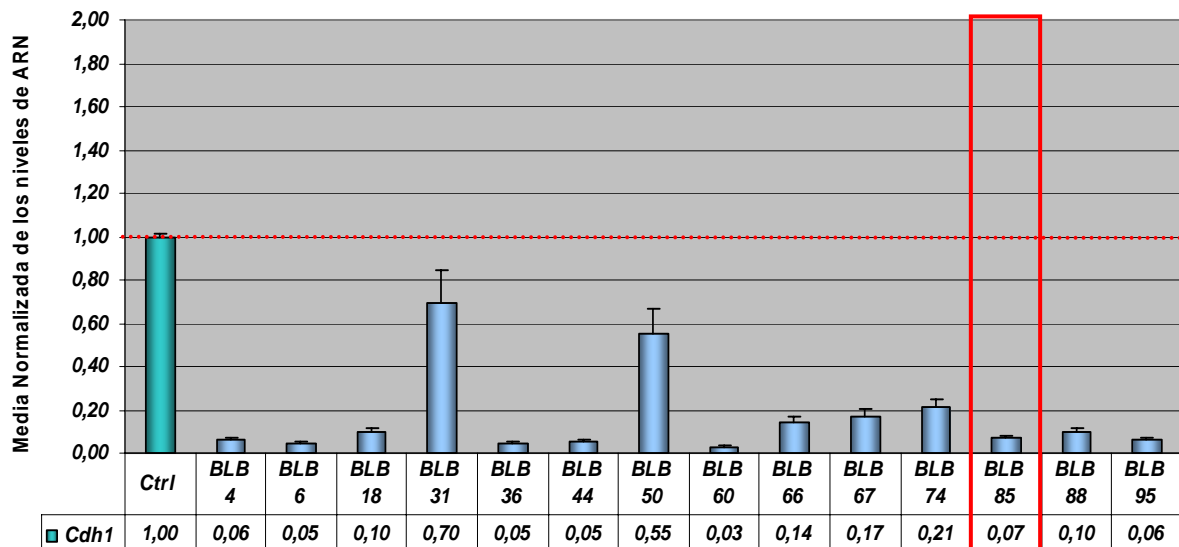
2.3 Mecanismos responsables de las alteraciones transcripcionales

2.3.1 Hipermetilación de regiones promotoras

Puesto que no se detectaron mutaciones que pudiesen explicar la bajada en la expresión transcripcional de ambos genes en los linfomas, y existen datos previos de otros autores que demuestran que la región promotora del gen *caderina E* aparece

Figura R2-2. Análisis de los niveles de ARN de los genes *Cdh1* y *Cdh2*. Ctrl, individuo F1 (C57BL/6JxBalb/cJ) no irradiado; BLBs, linfomas linfoblásticos de 14 individuos F1 (C57BL/6JxBalb/cJ).

En el caso de *Cdh1* (*caderina E*), todos los linfomas presentan niveles disminuidos del gen y en el caso de *Cdh2* (*caderina N*), 13 de 14 (92,85 %). El tumor BLB85 muestra aumento de la expresión de este último gen, dándose en este caso la situación conocida como “Intercambio de caderinas”.



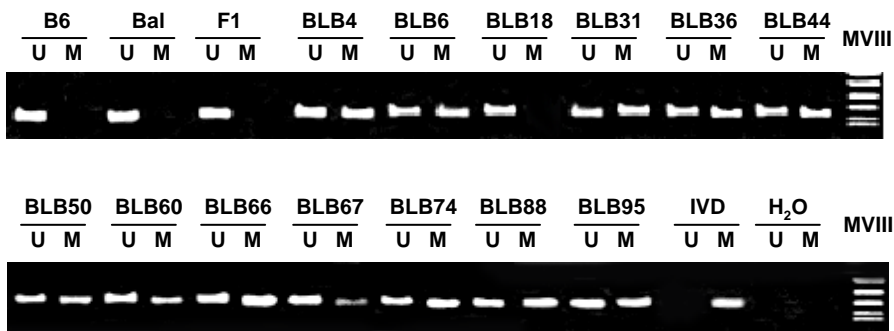
hipermetilada frecuentemente en otros tipos de cánceres [52, 53] incluyendo algunos hematológicos [49], el paso siguiente fue determinar si las disminuciones observadas en la cantidad de *ARN* se podían deber a mecanismos epigenéticos.

Para ello, se realizó el análisis de las regiones promotoras de ambos genes en muestras de *ADN* genómico procedentes de los mismos tumores anteriormente analizados, mediante ensayos de *PCR* específica de metilación (*MSP*, de sus siglas en inglés) y secuenciación, en colaboración con el laboratorio del Dr. Manel Esteller.

Para el gen *caderina N* se analizaron los perfiles de metilación en 27 dinucleótidos CpG que definían una isla no metilada en los controles (**Figura R2-3**). La hipermetilación del promotor de este gen fue detectada en el 85,71% (12 tumores de 14) de las muestras tumorales, comprobándose estos resultados mediante secuenciación del *ADN* tratado con bisulfito, utilizando oligonucleótidos que flanquean la región analizada. Todos los tumores que presentaban metilación en la región analizada mostraron niveles de expresión génica reducidos; mientras que en el único tumor en el que existía una ligera sobre-expresión del gen, no se apreciaba un patrón de metilación alterado (**TABLA R2**). La asociación entre la disminución del nivel de expresión de este gen en los tumores y la metilación de su región promotora fue significativa al aplicar el estadístico t de Student ($P < 0,05$).

El estatus de metilación del promotor de *caderina E* fue definido mediante la evaluación de los perfiles de metilación de 26 lugares CpG (isla CpG) (**Figura R2-4**). En este caso, sólo el 28,57% de los tumores analizados (4 linfomas de 14) mostraron hipermetilación de esta región (datos corroborados, como en el caso anterior, mediante secuenciación utilizando oligonucleótidos externos a la región analizada). Pero, aunque todas las muestras que presentaban hipermetilación del promotor de *Cdh1* tenían una clara reducción en la expresión génica el análisis estadístico (t de Student, $P > 0,01$), no se detectaron diferencias significativas entre estos dos parámetros, por lo que debería existir algún mecanismo adicional implicado en la inactivación de este gen en estos tumores.

Figura R2-3. Análisis de metilación de la región promotora del gen *Cdh2*. En la parte superior de la figura se muestra la *MSP* correspondiente al gen y en la inferior la determinación de las citosinas metiladas mediante el análisis por secuenciación. La mayoría de las muestras presentan su región promotora metilada. B6, individuo homocigoto de la cepa C57BL/6J; Bal, individuo homocigoto de la cepa BALB/cJ; F1, individuo heterocigoto no irradiado; BLBs, muestras de LT.



N-caderina

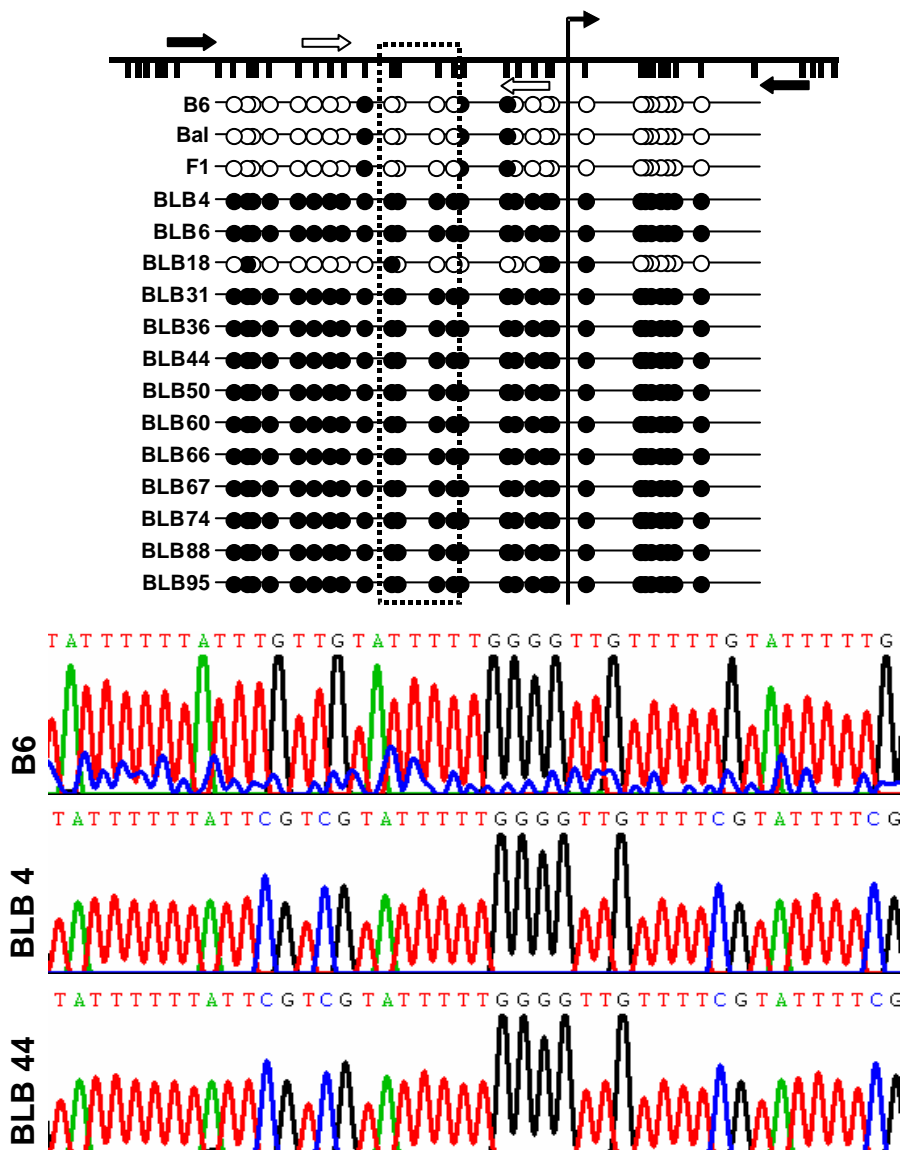
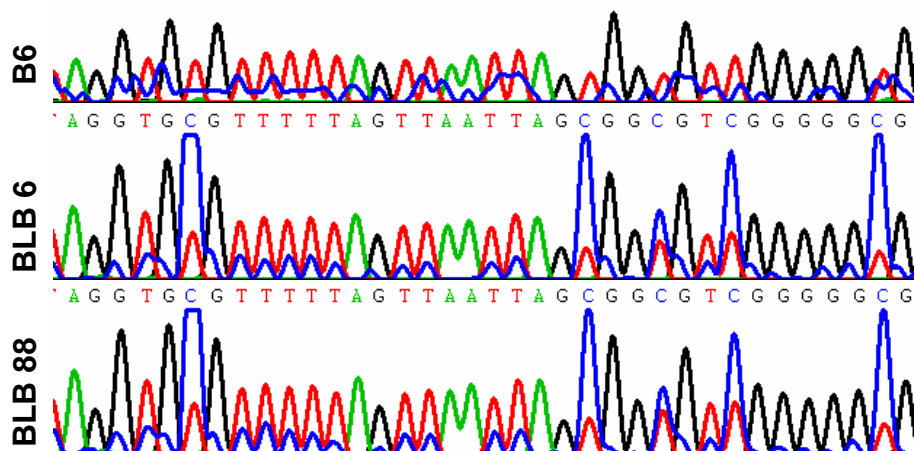


Figura R2-4. Análisis de metilación de la región promotora del gen *Cdh1*. En la parte superior de la Figura se muestra la *MSP* correspondiente al gen y en la inferior la determinación de las citosinas metiladas mediante el análisis por secuenciación. Sólo 4 muestras tienen hipermetilada su región promotora. B6, individuo homocigoto de la cepa C57BL/6J; Bal, individuo homocigoto de la cepa BALB/cJ; F1, individuo heterocigoto no irradiado; BLBs, muestras de LT.



2.3.1 Expresión transcripcional de *Sna1*

De los represores transcripcionales del gen *Cdh1*, *Snai1* (*Snail*) es sin duda uno de los más importantes [54, 55] y el aumento de su expresión podría explicar, al menos en parte, nuestros resultados.

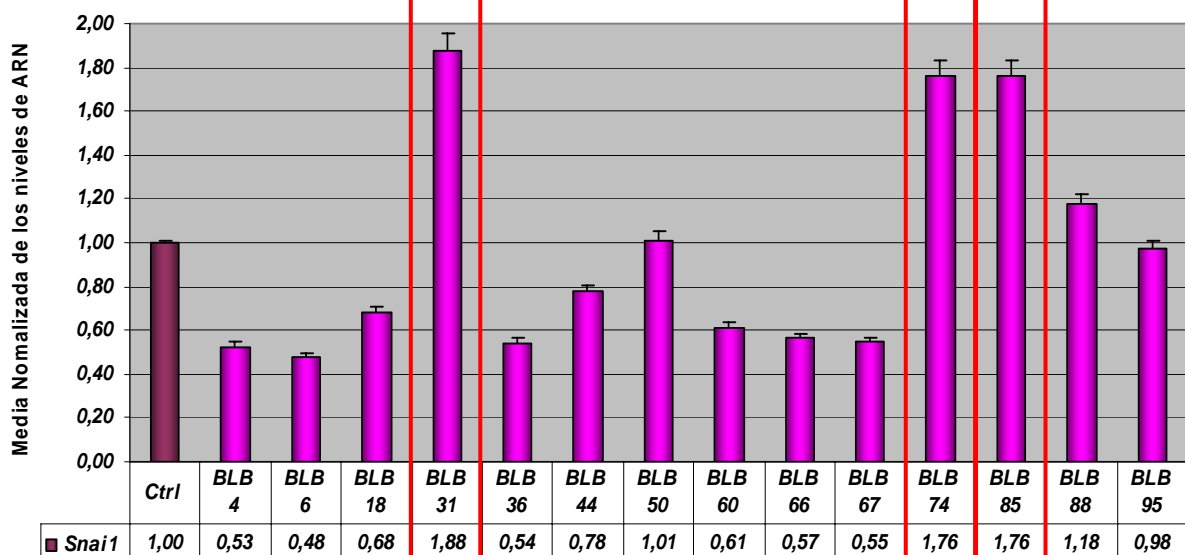
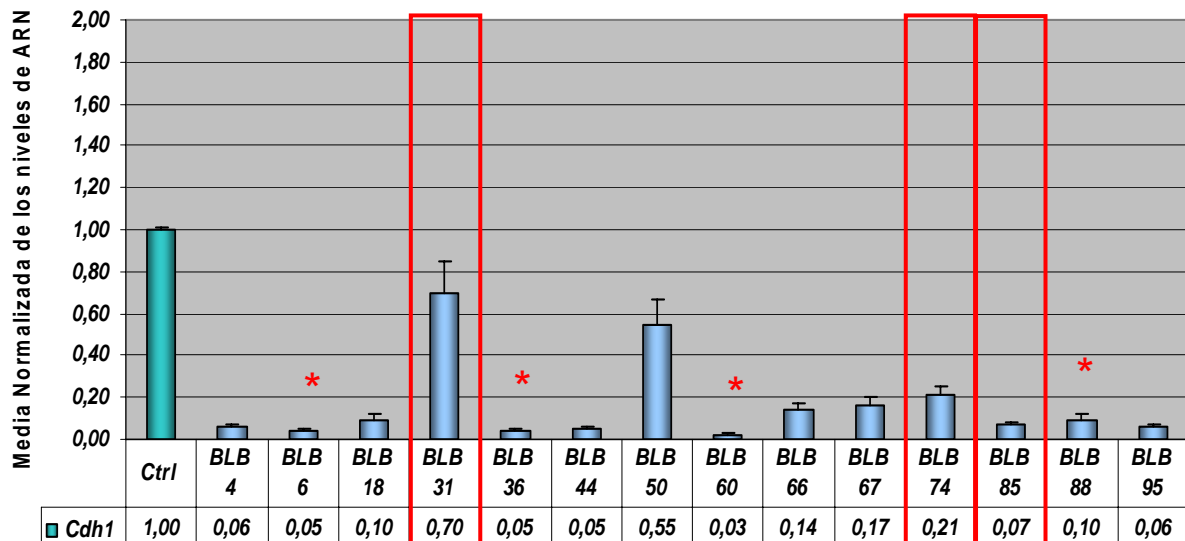
Al analizar en las mismas muestras tumorales, mediante *RT-PCR* cuantitativa en tiempo real, los niveles de expresión de *Snai1* se evidenció un aumento en la expresión de este gen en tres linfomas (**Figura R2-5**). Estas mismas muestras presentaban niveles de *ARN* para *caderina E* reducidos, sin metilación del promotor, y la relación entre ambos genes resultó significativa ($P < 0,05$). Como en el caso de los genes *Cdh1* y *Cdh2*, los datos obtenidos para *Snai 1* son también la media de tres medidas tomadas por cada uno de los dos experimentos realizados.

2.4 Análisis de niveles de proteínas caderinas *E* y *N* en linfomas linfoblásticos

Para comprobar si los perfiles de expresión de *ARN* de estos genes se correlacionaban con la cantidad de proteínas traducidas, se realizaron análisis de expresión mediante *Western blot* en los mismos tumores (**Figura R2-6**). Se utilizaron como controles positivos la cantidad de proteína correspondiente en extractos de células HaCaT para el caso de la caderina *E*, y de cerebro para el caso de la caderina *N*. Las cantidades de proteína se cuantificaron mediante densitometría y cada experimento se repitió tres veces.

En el caso de la caderina *E*, los niveles de *ARN* más bajos (valores entre 0,05 y 0,10) coincidían con la ausencia de proteína (9 de 14), y la mayoría de las muestras (2 de 3) con valores entre 0,14 y 0,21 para *ARN* mostraban sólo trazas de proteínas (BLB 66 y 74). Sólo dos muestras (BLB 31 y 50) no mostraban una buena correlación entre los niveles de *ARN* de este gen (0,70 y 0,55, respectivamente) y la cantidad de la proteína

Figura R2-5. Representación de los niveles de expresión de los genes *Cdh1* y *Snai1* en 14 muestras de linfomas linfoblásticos (BLBs). (*) Muestras con la región promotora del gen *Cdh1* hipermetilada. Todas las muestras presentan niveles disminuidos significativamente respecto del control en el caso del gen *Cdh1*, mientras que en el caso de *Snai1* 3 muestras presentan aumento significativo de los niveles de ARN. Las mismas muestras que tienen subida la expresión del represor Snail tienen disminuida la del gen *Cdh1*.



por inmunodetección (AUSENCIA) (**TABLA R2**).

En cuanto a la caderina N, los tumores con valores de *ARN* que oscilaban entre 0,15 y 0,30 mostraron ausencia total de proteína (6 de 14), y sólo dos muestras (BLB 6 y BLB 66) con valores mayores de *ARN*, de 0,39 y 0,71 respectivamente, mostraron trazas de proteína mediante inmunodetección. Sorprendentemente, en cinco tumores (BLB 18, 31, 50, 67 y 88) con valores de *ARN* de 0,48, 0,73, 0,72, 0,48 y 0,40, y en la muestra BLB 85 que presentaba sobre-expresión (1,39) no se detectó la cantidad de proteína correspondiente (**TABLA R2**).

Muestra	RT-PCR (LightCycler)			WB		MSP	
	<i>Cdh1</i>	<i>Cdh2</i>	<i>Snai1</i>	<i>Cdh1</i>	<i>Cdh2</i>	<i>Cdh1</i>	<i>Cdh2</i>
	Media Normalizada +/- ds	Media Normalizada +/- ds	Media Normalizada +/- ds				
F1(C57BL/6JxBALB/cJ)	1	1	1	+	+	U	U
BLB 4	0,06 +/- 0,0141	0,15 +/- 0,0071	0,53 +/- 0,0212	-	-	U	M
BLB 6	0,05 +/- 0,0071	0,71 +/- 0,0354	0,48 +/- 0,0141	-	- ^{1*}	M	M
BLB 18	0,10 +/- 0,0212	0,48 +/- 0,0212	0,68 +/- 0,0283	-	-	U	U
BLB 31	0,7 +/- 0,1485	0,73 +/- 0,0424	1,88 +/- 0,0778	-	-	U	M
BLB 36	0,05 +/- 0,0071	0,29 +/- 0,0141	0,54 +/- 0,0283	-	-	M	M
BLB 44	0,05 +/- 0,0141	0,30 +/- 0,0141	0,78 +/- 0,0283	-	-	U	M
BLB 50	0,55 +/- 0,1131	0,72 +/- 0,0424	1,01 +/- 0,0424	-	-	U	M
BLB 60	0,03 +/- 0,0071	0,22 +/- 0,0141	0,61 +/- 0,0283	-	-	M	M
BLB 66	0,14 +/- 0,0283	0,39 +/- 0,0212	0,57 +/- 0,0212	- ^{1*}	- ^{1*}	U	M
BLB 67	0,17 +/- 0,0354	0,48 +/- 0,0212	0,55 +/- 0,0212	-	-	U	M
BLB 74	0,21 +/- 0,0424	0,26 +/- 0,0141	1,76 +/- 0,0707	- ^{1*}	-	U	M
BLB 85	0,07 +/- 0,0141	1,39 +/- 0,0778	1,76 +/- 0,0707	-	-	U	U
BLB 88	0,10 +/- 0,0212	0,40 +/- 0,0212	1,18 +/- 0,0495	-	-	M	M
BLB 95	0,06 +/- 0,0141	0,19 +/- 0,0141	0,98 +/- 0,0354	-	-	U	M

Tabla R2. Resumen de resultados de expresión por RT-PCR (LightCycler), WB y resultados de metilación por MSP de los genes *Cdh1* y *Cdh2*, así como los resultados de expresión por RT-PCR (LightCycler) de *Snai1*. (+) representa valores de expresión similares a los de los individuos control; (-), representa valores de expresión reducidos; (-*), representa trazas de expresión; M, metilación; U, no metilación.

2.5. Análisis de expresión de caderinas E y N en muestras sometidas a distintos tratamientos

2.5.1 Inmunofluorescencia

Para obtener información más detallada se determinó la expresión de estas proteínas mediante inmunofluorescencia en el timo, no sólo en los linfomas linfoblásticos (n=3), sino también en timos de ratones que no desarrollaron este tipo de enfermedad durante un periodo de latencia similar tras el mismo tratamiento (n=3), y de animales irradiados con una única dosis (n=5). De este modo, se pudo determinar el comportamiento de ambos genes en respuesta a la radiación detectando su localización en el espacio intratímico.

Las células positivas para la tinción con anticuerpo anti-caderina E (**Figura R2-7**) se localizaron principalmente en la médula tímica de las muestras control (**Figura 2-7A**). En los linfomas linfoblásticos (**Figura 2-7D**) la señal se apreció en escasos acúmulos de células dispersos aleatoriamente por la glándula desorganizada. En los timos de individuos que no llegaron a desarrollar linfoma (**Figura 2-7E**) las células positivas para caderina E se distribuyeron homogéneamente por el órgano, aunque sin organizarse en la estructura medular reconocible en los controles. Por último, en los timos de ratones sometidos a tratamiento con una única dosis de radiación (**Figura 2-7F**) el patrón de tinción para esta proteína era el inverso al de la situación control y se circunscribía a la zona periférica, correspondiente a la corteza. En todos los casos, la proteína era claramente patente en la superficie celular (**Figura 2-7C**).

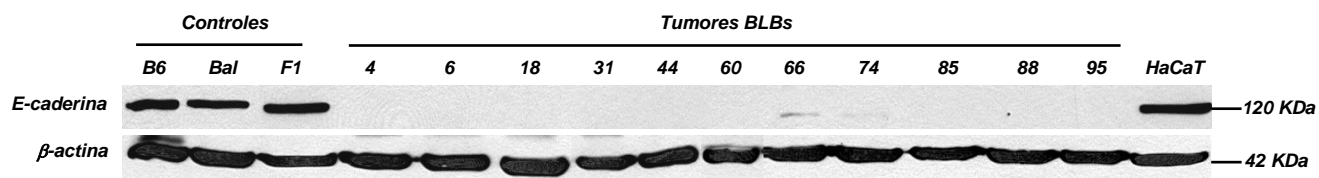
No se pudo realizar este análisis para la caderina N debido probablemente a la escasa cantidad de esta proteína en el timo de ratón (comprobado mediante inmunoprecipitación (**Figura R2-8**)).

Figura R2-6. Análisis mediante WB de caderina E y caderina N. B6, individuo homocigoto de la cepa C57BL/6J; Bal, individuo homocigoto de la cepa BALB/cJ; F1, individuo heterocigoto no irradiado; BLBs, muestras de LT. HaCat, control positivo de caderina E; Cer, control positivo de caderina N. Los tumores BLB 66 y 74 muestran trazas de E-caderina y BLB 6 y 66 para caderina N.

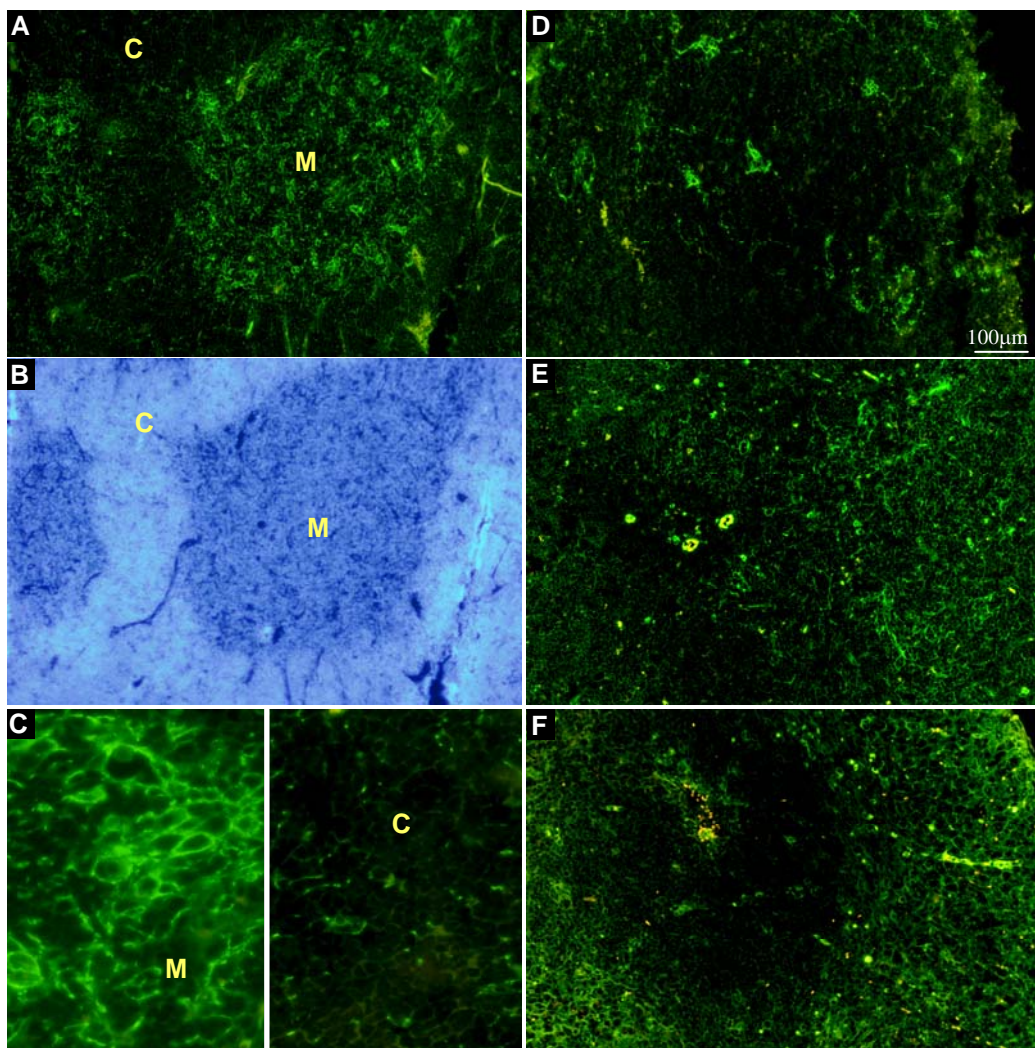
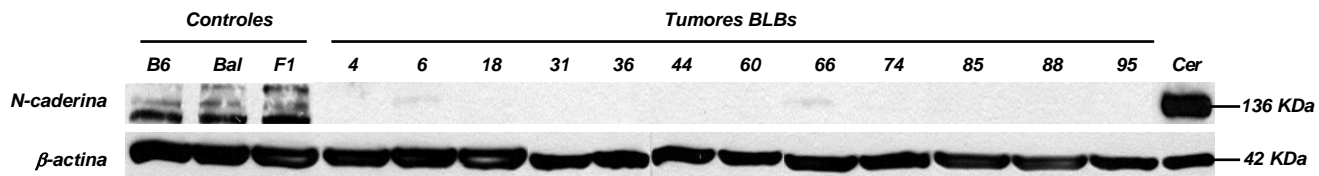
Figura R2-7. Inmunodetección de caderina E mediante inmunofluorescencia. **A**, Caderina E en sección representativa de timos no tratados. **B**, Contratinción con *DAPI* en sección representativa de timos no tratados. **C**, Detalle de zona medular (**M**) y de zona cortical (**C**) de timo no tratado. **D**, E-caderina en sección representativa de linfomas linfoblásticos. **E**, Caderina E en sección representativa de timos tratados que no desarrollaron linfoma. **F**, Caderina E en sección representativa de timos irradiados con dosis única.

Mientras en la muestra control, la proteína se localiza principalmente en la zona medular, en los timos de individuos con LL se aprecian acúmulos positivos dispersos por la glándula desorganizada. En muestras No LT la señal se distribuye más homogéneamente aunque sin llegar a estructurarse en zonas bien definidas de C y M. En las muestras DU el patrón de tinción para esta proteína queda invertido.

a



b



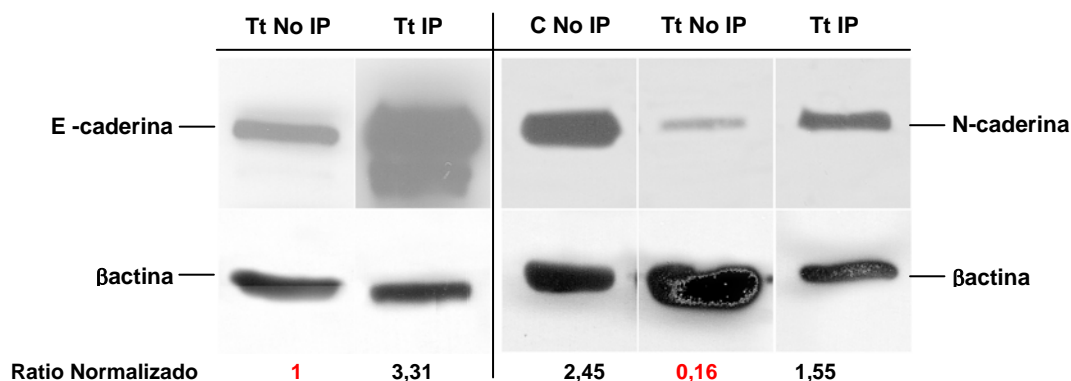


Figura R2-8. Immunoprecipitación de caderinas E y N en muestras de individuos no tratados. Tt No IP, timo total No Immunoprecipitado; Tt IP, timo total Immunoprecipitado; C No IP, cerebro No Immunoprecipitado.

Al comparar los ratios normalizados (caderina/ β actina) de las distintas muestras, tomando como referencia (valor=1) el ratio de E-caderina en las muestras de timo sin inmunoprecipitar se observa que la cantidad de N-caderina que se detecta es cerca de 7 veces menor. En muestras inmunoprecipitadas, esta diferencia se reduce a la mitad, aproximadamente.

2.5.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

El análisis de los niveles de *ARNm* de ambos genes en los diferentes los grupos de muestras mencionados evidenció un comportamiento similar de ambos genes (**Figuras R2-9 y R2-10**).

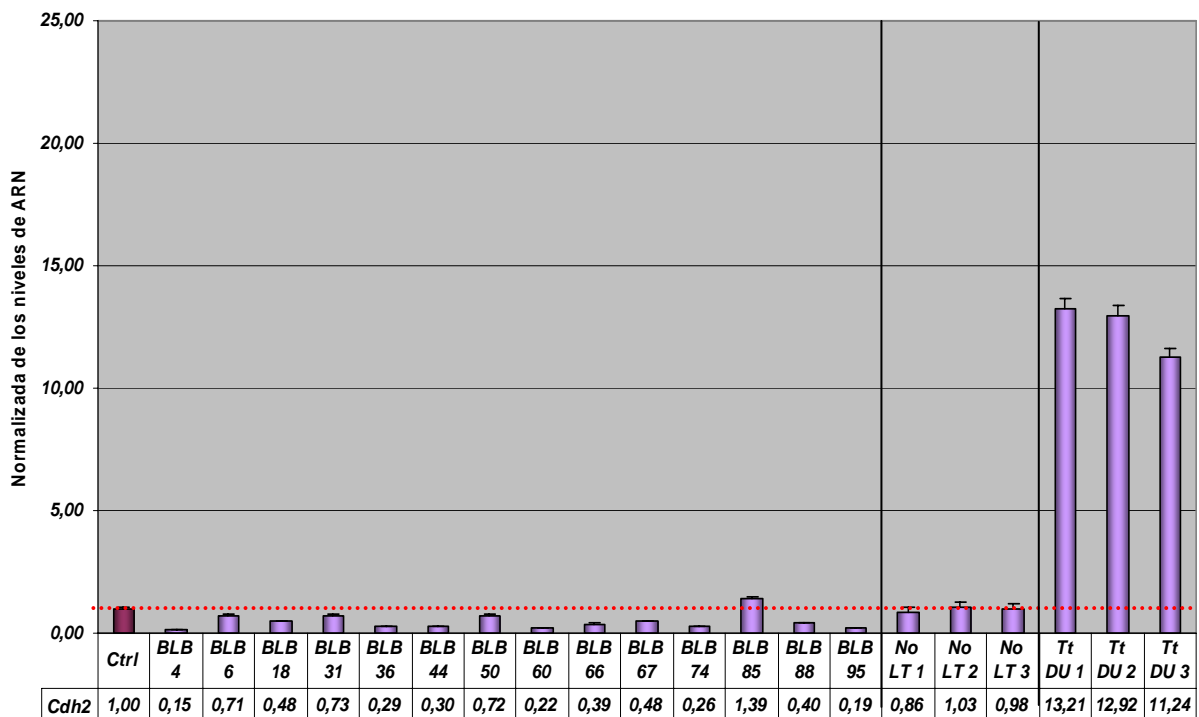
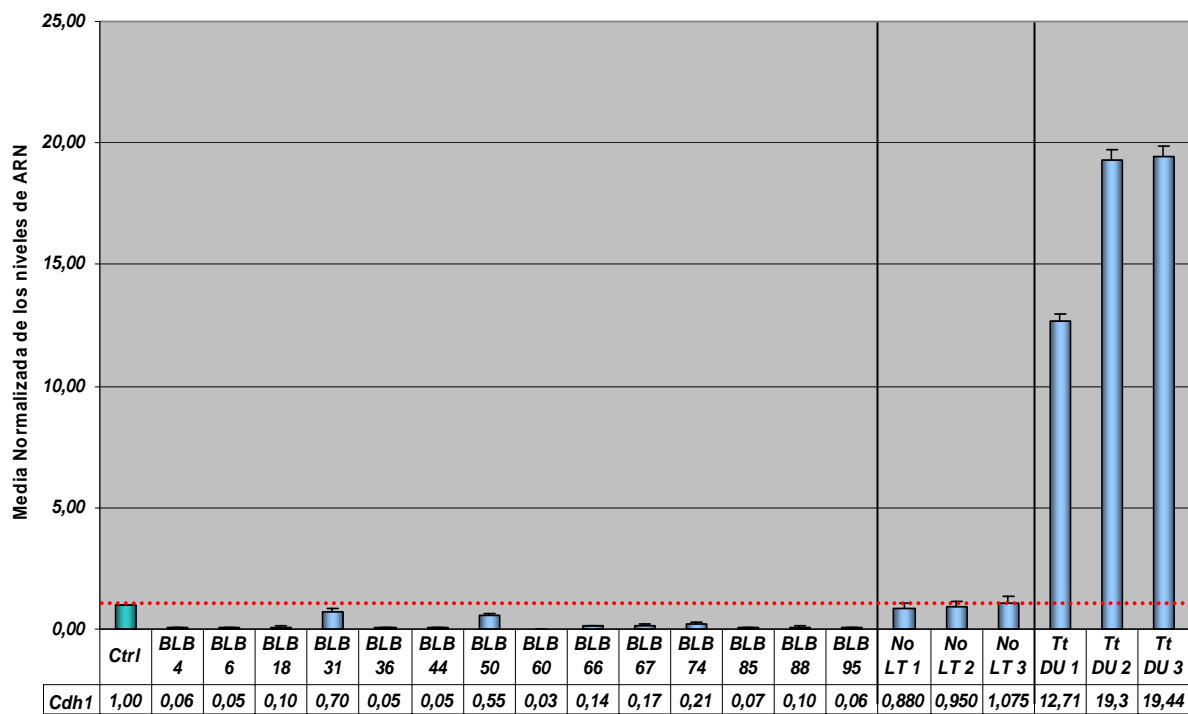
Así, en los linfomas linfoblásticos (n=14) la expresión de estos genes tiende a disminuir en la totalidad de los casos para *caderina E* y en el 92,85% para *caderina N*. En las muestras de individuos tratados con dosis sucesivas que tras el periodo de latencia no desarrollaron linfomas (n=3) los niveles de *ARN* no se diferenciaron significativamente ($P > 0,05$) de los que se detectaron en los timos controles: valores entre 0,88 y 1,07 para *caderina E* y de 0,86 a 1,03 para *caderina N*. Finalmente, en los timos de individuos tratados con una única dosis de radiación (n=3) la expresión de ambos genes aumentó significativamente ($P < 0,05$), oscilando los valores entre 12,7 y 19,4 para el caso de *caderina E* y entre 11,24 y 13,21 para el de *caderina N*. De nuevo los datos obtenidos son la media de tres grupos de valores tomados en cada uno de los dos experimentos realizados.

Figura R2-9. Niveles de ARN del gen *Cdh1* en muestras sometidas a distintos tratamientos. Ctrl, individuo F1 (C57BL/6JxBalb/cJ) no irradiado; **BLBs**, linfomas linfoblásticos de 14 individuos F1 (C57BL/6JxBalb/cJ); **No LT**, muestras de 3 individuos sometidos a tratamiento que no desarrollaron linfoma; **DU**, muestras de 3 individuos irradiados con dosis única.

Los niveles de ARN en muestras LL son inferiores a los que se detectan para el control en todos los casos, mientras que en muestras No LT los valores son similares a los del individuo no tratado. En respuesta a una única dosis de radiación los niveles de ARN del gen aumentan.

Figura R2-10. Niveles de ARN del gen *Cdh2* en muestras sometidas a distintos tratamientos. Ctrl, individuo F1 (C57BL/6JxBalb/cJ) no irradiado; **BLBs**, linfomas linfoblásticos de 14 individuos F1 (C57BL/6JxBalb/cJ); **No LT**, muestras de 3 individuos sometidos a tratamiento que no desarrollaron linfoma; **DU**, muestras de 3 individuos irradiados con dosis única.

Los niveles de ARN en muestras LL son inferiores a los que se detectan para el control en todos los casos, mientras que en muestras No LT los valores son similares a los del individuo no tratado. En respuesta a una única dosis de radiación los niveles de ARN del gen aumentan.



Objetivo 3

Análisis de los perfiles de expresión de las
vías de señalización de Wnt y de Hedgehog

3.1. Análisis de expresión de las vías de Wnt y Hh mediante matrices

Como se comentó en la introducción, las vías de Hedgehog y Wnt han sido implicadas en el control de la supervivencia y proliferación de los timocitos. Concretamente, la vía de señalización de Wnt está alterada en distintos tipos de cánceres humanos, incluidos algunas leucemias [15]. Además, puesto que habíamos demostrado que la caderina E está desregulada en los linfomas tímicos se quiso averiguar si la vía de Wnt, con la que esta proteína podría tener una relación antagónica, estaba también alterada en nuestros linfomas T. Por estos motivos, se consideró oportuno realizar un análisis de expresión utilizando una *matriz* específica (GEArray Q Series Kit Mouse Wnt Signaling Pathway” (SuperArray) para ver si se encontraban alteradas las tasas de expresión de los 96 genes más representativos.

Para la consecución de este objetivo se partió de los datos resultantes del análisis de una micromatriz de expresión (RatonChip, del CNIO) que habían sido obtenidos por Manuel Guerrero, en el marco de una colaboración que nuestro equipo viene manteniendo con el Dr. Marcos Malumbres en el CNIO.

Para estos análisis las muestras de ARN se obtuvieron del timo completo de 7 individuos que desarrollaron linfoma tras ser irradiados y de 5 ratones que no fueron sometidos a tratamiento.

Los datos más sobresalientes detectados (**Tabla R3**) se podrían resumir en la sobre-expresión de 2 genes en nuestros linfomas: *Smo* y *Myc*, y la bajada de expresión de otros 8 genes: *Aes*, *Apc*, *Ccnd2*, *Ccnd3*, *Enpp2*, *Id3*, *Nos2*, *Tcf7* y *Wnt4*. Estas observaciones fueron validadas mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Puesto que existían evidencias previas de que alguno de estos genes se expresaba sólo en fracciones celulares específicas del timo, el análisis de expresión se repitió utilizando muestras de ARN purificado a partir de las fracciones celulares separadas (células estromáticas y timocitos) de tres linfomas linfoblásticos y de tres ratones sin irradiar.

El estudio de la fracción estromática puso de manifiesto aumentos significativos (nivel de significación establecido por software “GEArrayAnalyzer” – SuperArray -: $\text{boundary} > 1,2$) para dos genes: *Fosl1* y *Mbd4*, y disminuidos para 4: *Aes*, *Ccnd3*, *Ctbp2* y *Dvl3*; mientras que los timocitos presentaban sobre-expresados significativamente ($\text{boundary} > 1,2$) los genes *Ctbp1* y *Wnt9a*, y con niveles bajos de expresión *Apc*, *Ccnd2*, *Ctbp2*, *Erg1* y *Tcf7*. La validación de los resultados se realizó también en este caso mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real para los genes *Aes*, *Dvl3*, *Apc* y *Tcf7* y mediante la confirmación de *spots* negativos y positivos incluidos en las membranas de nylon.

Este pequeño grupo de genes alterados podían clasificarse en tres categorías posibles:

- A. Incluidos en la vía de señalización de Hedghog: *Smo*
- B. Incluidos en la vía de señalización canónica:
 - Ligandos y receptores: *Wnt4* y *Wnt9a*
 - Moléculas intracelulares: *Aes*, *Apc*, *Ctbp2*, *Dvl*, *Ctbp1* y *Mbd4*
 - Proteínas de ciclo celular: *Ccnd2* y *Ccnd3*
 - Enzimas: *Enpp2*
 - Factores de transcripción: *Irb3*, *Tcf7*, *Fosl1* y *Myc*
- C. Implicados en la vía no canónica: *Erg1* y *Nos2*

A partir de estos datos, se eligieron una serie de genes para realizar un estudio más detallado. Además del gen de la caderina E, se seleccionaron:

- *Smo*, porque es el único componente no-redundante de la vía Hedghog y forma parte de una intersección con la vía de Wnt.
- *Wnt4*, porque su expresión ya había sido descrita en el timo [18]
- *Aes*, por ser un inhibidor de factores de transcripción de la familia Tcf/Lef
- *Tcf7* (*Tcf-1*), por ser un factor de transcripción implicado en los procesos de

maduración de células T [18]

- *Myc*, porque es un gen diana de esta ruta y por su implicación en el desarrollo de los linfomas tímicos murinos [11, 33].

TABLA R3: Genes implicados en la ruta Wnt y Hedghog							
	Timo Total	Timocitos	Estroma		Timo Total	Timocitos	Estroma
Aes				Jun			
Apc				Lef1			
Apc2	NC			Lrp5	NC		
Axin1				Lrp6			
Axin2	NC			Mbd4			
Bmp4				Mmp7	NC		
Btrc				Msx1	NC		
Ctnnb1				Msx2	NC		
Ctnnbip1	NC			Myc			
Ccnd1				Nkd1	NC		
Ccnd2				Nkd2			
Ccnd3				Nos2			
Cd44				Pitx2	NC		
Cdx1	NC			Plaur			
Cer1	NC			Porcn			
Cldn1	NC			Ppp2r5d	NC		
Col1a1				Ptgs2			
Ctbp1				Ret			
Ctbp2	NC			Sfrp1	NC		
Dkk1				Sfrp2			
Dkk2	NC			Sfrp4	NC		
Dkk3	NC			Smo			
Dkk4	NC			Sox17	NC		
Dvl1	NC			T	NC		
Dvl2				Tcf3	NC		
Dvl3				Tcf7			
Efnb1	NC			Vegfa			
Egr1				Wif1	NC		
Enpp2				Wisp1			
Fgf4	NC			Wisp2			
Fosl1				Wnt1			
Frat1	NC			Wnt10a	NC		
Frzb	NC			Wnt10b			
Fst	NC			Wnt11			
Fzd1				Wnt16			
Fzd10				Wnt2			
Fzd2	NC			Wnt2b			
Fzd3	NC			Wnt3	NC		
Fzd4				Wnt4			
Fzd5	NC			Wnt5a	NC		
Fzd6	NC			Wnt5b			
Fzd7				Wnt6	NC		
Fzd9	NC			Wnt7a	NC		
Gja1				Wnt7b	NC		
Gsk3b				Wnt8a	NC		
Icam1	NC			Wnt8b			
Id2				Wnt9a	NC		
Id3				Wnt9b	NC		

3.2 Análisis de expresión más detallado de los genes seleccionados

3.2.1 En muestras de ratones no irradiados

En primer lugar se determinó la expresión relativa de los genes en las fracciones celulares separadas procedentes de 3 ratones que no fueron irradiados (controles) mediante *RT-PCR* cuantitativa en tiempo real (**Figura R3-1**), tomando como referencia el valor de los niveles de expresión de los genes en el timo total (valor=1).

Se podría concluir que *Cdh1*, *Cdh2* y *Wnt4* son expresados mayoritariamente por el estroma tímico siendo sus niveles prácticamente indetectables en timocitos, mientras que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la contribución de ambas fracciones con respecto a los genes *Smo*, *Aes*, *Myc* y *Tcf7*.

3.2.2 En muestras de ratones irradiados con dosis única

Para evaluar el comportamiento de estos genes en los tratamientos con radiación, se determinó el grado de su respuesta ante una dosis única de radiación y siguiendo la misma metodología que en el apartado anterior (**Figura R3-2**).

La comparación de los resultados obtenidos en las fracciones estromáticas de muestras irradiadas con las de estas mismas fracciones extraídas de ratones control evidenció una subida significativa ($P < 0,05$) en los niveles de ARN de los genes *Cdh1* (valor de 6,53, es decir más de seis veces superiores), *Wnt4* (valor de 2,47) y *Myc* (valor de 3,60). En los otros genes (*Smo*, *Aes* y *Tcf7*) las diferencias observadas no fueron significativas.

En el caso de la fracción de timocitos el resultado fue completamente similar, con la salvedad de que el valor más alto lo alcanzó *Wnt4* (9,54 veces superior en los timocitos de ratones tratados), seguido de *Cdh1* (3,55) y *Myc* (1,70).

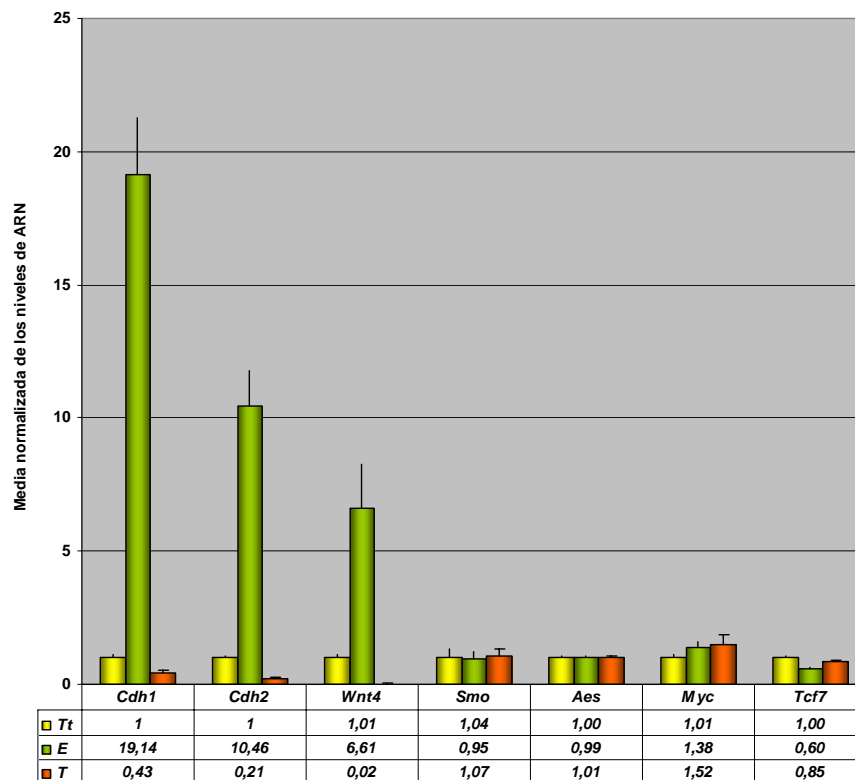


Figura R3-1. Expresión relativa de diferentes genes en muestras de ratones no irradiados. Tt, muestras de ARN obtenidas a partir de timo total; E, muestras de ARN obtenidas a partir de la fracción estromática; T, muestras obtenidas a partir de los timocitos aislados. Expresión diferencial significativa de los genes *Cdhl*, *Cdh2* y *Wnt4* en la fracción estromática.

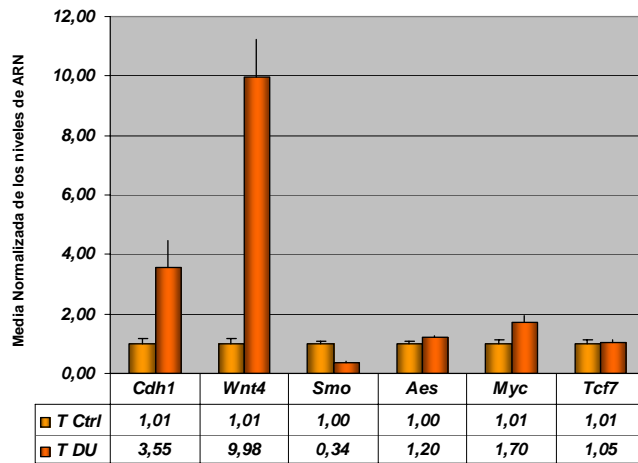
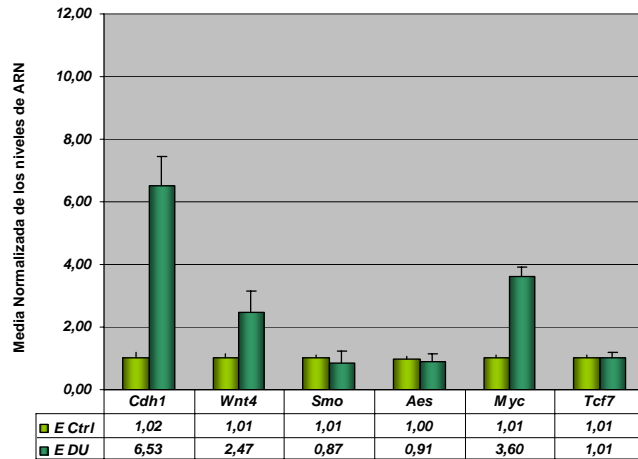


Figura R3-2: Expresión de diferentes genes en muestras de ratones irradiados con dosis única. E Ctrl, fracción estromática obtenida a partir de ratones control; E DU, fracción estromática obtenida a partir de muestras tratadas con una sola dosis de radiación. En ambas fracciones celulares fueron significativas las diferencias para los genes *Cdh1*, *Wnt4* y *Myc*.

3.3.3 En muestras de ratones que desarrollaron linfoma linfoblástico

En los linfomas tímicos inducidos durante el periodo correspondiente de latencia tras cuatro dosis de 1,75 Gy, las alteraciones más significativas detectadas en las células estromáticas (**Figura R3-3A**) fueron:

- Disminución significativa ($P<0,05$): en el 100% de los casos, de *Cdh1* y *Wnt4*
- Aumento significativo ($P<0,05$): en el 70% de los tumores, de los niveles de ARN de *Myc* y *Smo*.
- Disminución y aumento, con diferencias significativas:
 1. *Aes* tiende a disminuir en el 50% de los casos y a aumentar en un 20%.
 2. *Tcf7* aumenta en un 10% de los tumores y disminuye en un 20%

En la fracción de timocitos (**Figura R3-3B**):

- Disminución significativa ($P<0,05$):
 1. en el 80% de los tumores, de los niveles de *Aes*
 2. en 70% de los tumores, de los niveles de *Tcf7*.
- Aumento significativo ($P<0,05$):
 1. en el 90% de los tumores, de *Myc*
 2. en el 30% de los tumores, de *Wnt4*
- Disminución y aumento, con diferencias significativas ($P<0,05$):
 1. *Cdh1* disminuye en el 20% y aumenta en el 50% de los linfomas
 2. *Smo* disminuye en el 20% y aumenta en el 50% de los tumores

Tomando en consideración que la secuencia particular de cambios puede ser diferente en cada tumor, pues cada una de las alteraciones pueden darse más temprano en célula y más tarde en otra teniendo un efecto diferente [3], se podrían interpretar los resultados en base a la posible activación de la ruta de Wnt y/o la ruta de Hedghog (en el caso de que únicamente esté sobre-expresado *Smo*).

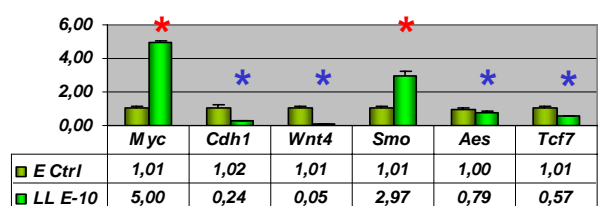
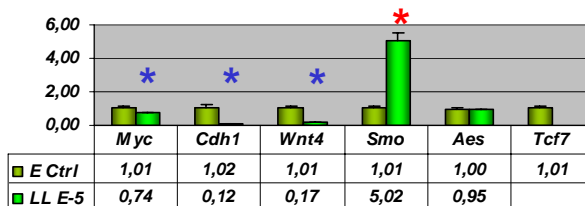
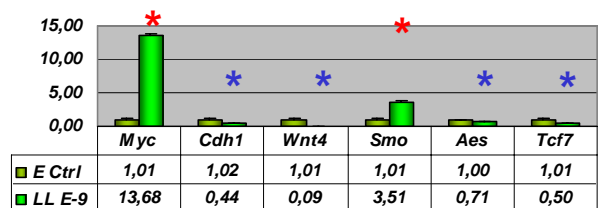
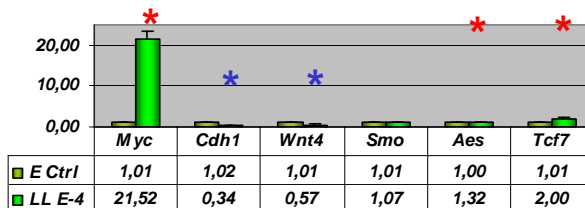
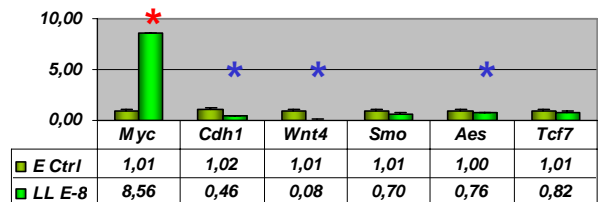
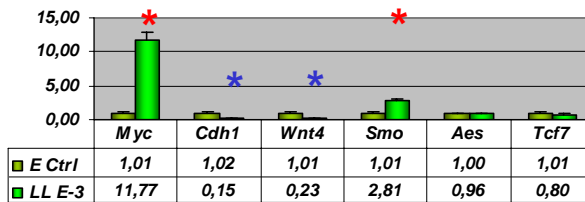
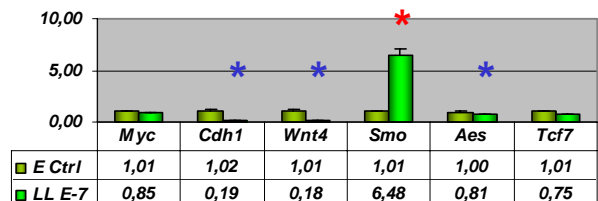
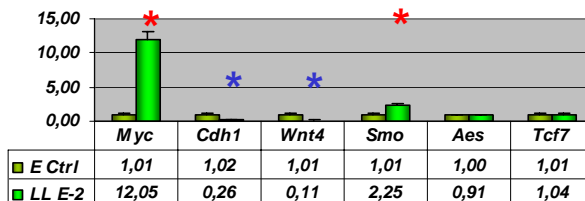
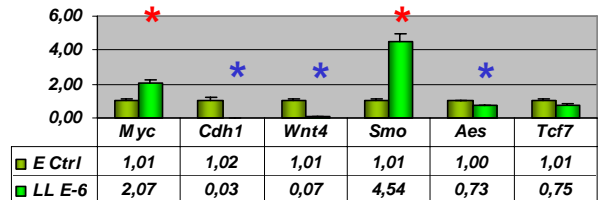
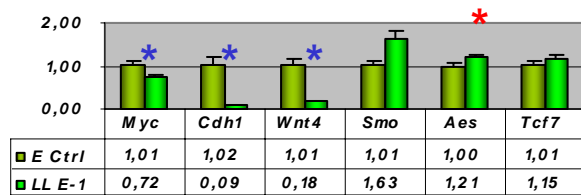


Figura R3-3A. Alteraciones génicas en fracción estromática de linfomas linfoblásticos. Resumen de resultados de análisis mediante RT-PCR (LightCycler) de 6 genes en la fracción estromática (E) de un grupo de linfomas linfoblásticos murinos inducidos media te radiación β . (*) representa aumento (rojo) o disminución (azul) significativos de los niveles de ARN.

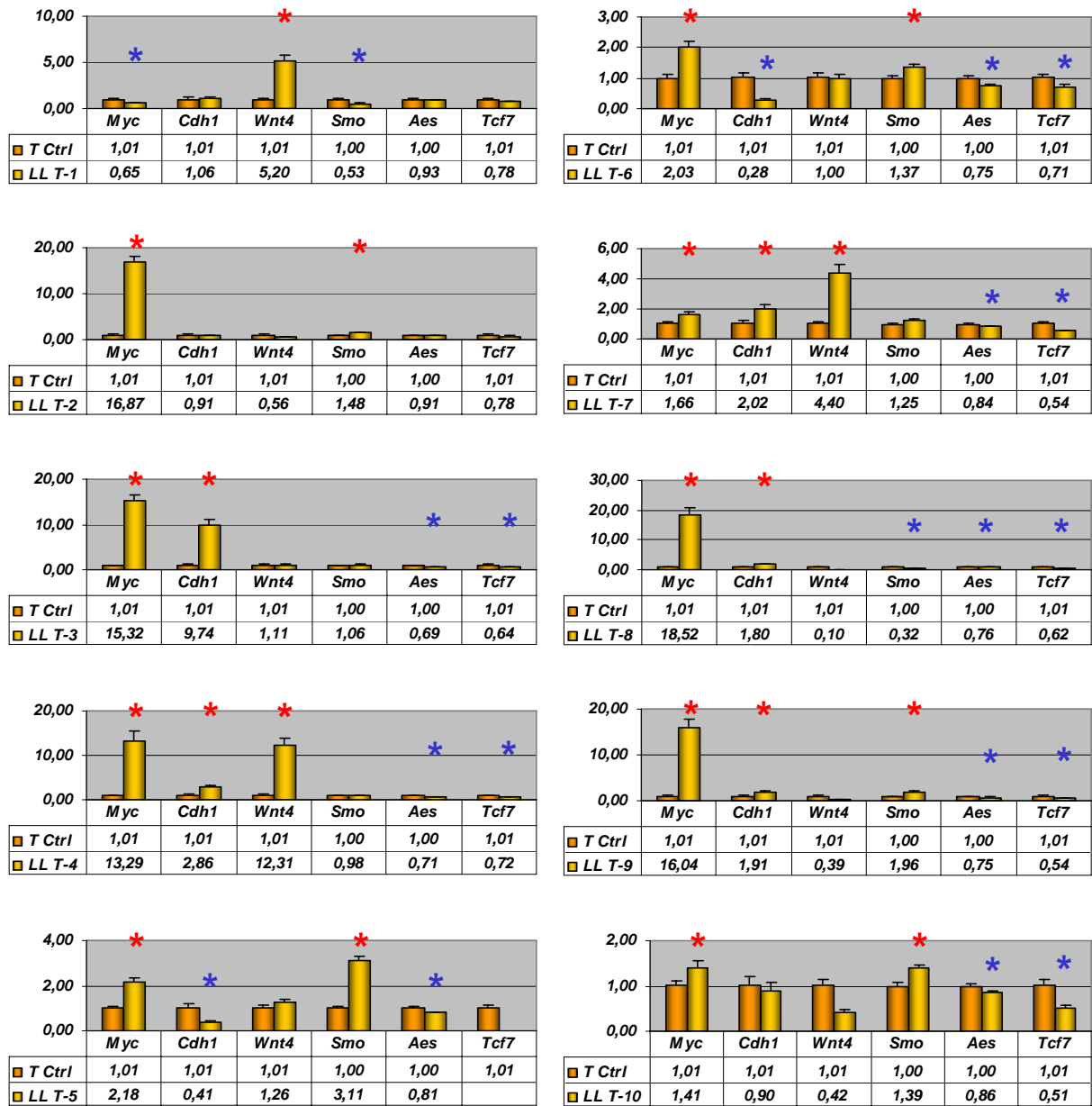


Figura R3-3B: Alteraciones génicas en timocitos de linfomas linfoblásticos. Resumen de resultados de análisis mediante RT-PCR (LightCycler) de 6 genes en la fracción de timocitos (T) de un grupo de linfomas linfoblásticos murinos inducidos media te radiación β . (*) representa aumento (rojo) o disminución (azul) significativos de los niveles de ARN.

En la fracción estromática aparecen dos genes que en todos los casos disminuyen su expresión: *Cdh1* y *Wnt4* lo que demuestra que la ruta no está activada por este ligando en esta fracción celular.

- **LL E-1:** la disminución de *Myc*, junto con el aumento de *Aes* sugieren que ninguna de estas vías está alterada.
- **LL E-2, LL E-3:** Parecen tener **activada la vía de Hedghog**, pues aparecen sobre-expresados en esta muestra *Smo* y *Myc*.
- **LL E-4:** En este caso, parece estar **alterada la vía de Wnt** debido a la mayor sobre-expresión de *Tcf7* que de *Aes*, y al aumento de *Myc*.
- **LL E-5:** La sobre-expresión de *Smo* sugiere la **activación de la vía de Hedghog**.
- **LL E-6, LL E-7:** Parecen tener **activadas ambas rutas**, pues aparece sobre-expresado *Smo* y *Myc* (en la muestra 6) y disminuido *Aes*.
- **LL E-8:** La disminución de *Aes* y la sobre-expresión de *Myc*. Apuntan hacia la **alteración de la vía de Wnt**.
- **LL E-9, LL E-10:** Parecen tener **activada la vía de Hedghog**, debido a la sobre-expresado *Smo* y *Myc*, y a la mayor disminución de *Tcf7* que de *Aes*.

En los timocitos:

- **LL T-1:** La disminución de *Smo* y el aumento de *Wnt4*, parecen indicar que este tumor tiene **activada la vía de Wnt**.
- **LL T-2:** En este caso, parece que la que está **activada es la ruta de Hh**, pues muestran aumento en sus niveles de expresión *Smo* y *Myc*.
- **LL T-3, LL T-8:** En estos tumores *Cdh1* presenta un aumento significativo en sus niveles de expresión que junto con las disminuciones de *Aes* y *Tcf7* sugieren que ninguna de estas vías está activada.
- **LL T-4, LL T-7:** El aumento de *Wnt4* y *Myc* sugieren la **activación de la vía de Wnt**, a pesar de la disminución de *Aes* y *Tcf7*. *Cdh1* también

está sobre-expresado.

- **LL T-5, LL T-6:** Podrían tener **activada la vía de Hedghog** ya que *Smo* y *Myc* aparecen aumentados. La disminución de *Aes* y *Tcf7* sugiere que la vía de Wnt no está activada. En estos timocitos tumorales *Cdh1* disminuye sus niveles de expresión.
- **LL T-9:** El aumento de *Smo* y *Myc* sugiere la posible **activación de la vía de Hedghog**, mientras que la disminución de *Aes* y *Tcf7* apunta hacia la no activación de la vía de Wnt. *Cdh1* está sobre-expresado en este caso.
- **LL T-10:** Podría tener **activada la vía de Hedghog** ya que presenta aumento de *Smo* y *Myc*, además de una mayor disminución de *Tcf7* que de *Aes*.

DISCUSIÓN

El cáncer sobreviene cuando las células especializadas adquieren características de células inmaduras, o cuando las células indiferenciadas no consiguen llevar a cabo con éxito el programa de maduración para el que están determinadas, y además adquieren propiedades invasivas y metastáticas, angiogénicas, de crecimiento autónomo y de evasión de la apoptosis. En el timo conviven células indiferenciadas (precursores de timocitos, timocitos *DN* y *DP*) y especializadas (células estromáticas) que interaccionan unas con otras para que las primeras puedan llevar a término su programa de maduración [7]. En este contexto, existe un control homeostático de los procesos de proliferación y diferenciación de las células *DN*, desde su entrada en el timo, hasta su maduración como células T (*SP*) preparadas para salir al torrente circulatorio, pasando por los procesos de selección (negativa y positiva) y otras respuestas adaptativas [48].

Existen numerosos trabajos que describen alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores en los timocitos para explicar el desarrollo de esta clase de linfomas [11, 26-29, 31-33, 56-60]. Sin embargo, hasta ahora se habían aportado pocas evidencias sobre alteraciones en las moléculas de adhesión, o de componentes de las vías de Wnt y de Hedgehog, y desde luego no se ha descrito nada sobre la alteración de genes expresados por las células estromáticas, que pudieran estar implicados en el origen y/o desarrollo de los linfomas linfoblásticos de células T. Es decir, sobre la co-evolución de estroma y timocitos como un hecho necesario para el desarrollo de los linfomas.

1. La inactivación de los genes *Cdh1* y *2*, que codifican para dos caderinas clásicas, podría contribuir al desarrollo de los linfomas linfoblásticos T mediante la alteración de los mecanismos de comunicación intercelular

Los diálogos célula-célula mediados, entre otras moléculas por las caderinas clásicas, son imprescindibles para la regulación coordinada del crecimiento, la diferenciación, la apoptosis y la migración celular. En concreto, estas caderinas están implicadas en la formación y el mantenimiento de la arquitectura de los tejidos, y

desempeñan un papel fundamental en las interacciones entre células en los procesos de desarrollo y progresión tumorales [51].

La caderina N es una proteína mesenquimal implicada en procesos de diferenciación en médula ósea humana gracias a su expresión en precursores hematopoiéticos y en células estromáticas [61], mientras que la caderina E es una proteína epitelial que influye en la maduración de los timocitos de ratón, mediante interacciones homotípicas entre células de la médula tímica y células T inmaduras [24]. Aunque en el ser humano también se han descrito interacciones heterotípicas, entre la E-caderina del estroma tímico y la integrina $\alpha E\beta 7$, expresada por los timocitos, que favorecen la proliferación de estas últimas células [62], la interrupción de estas interacciones no parece alterar la organización epitelial tímica ni el desarrollo de los timocitos en ratón. Sin embargo, la falta de contactos homotípicos supone la desorganización tisular y de los programas de diferenciación de timocitos que quedan incompletos [24]. Se ha demostrado que la ausencia en el timo de células mesenquimales impide el desarrollo completo de timocitos maduros [63]. Otro dato a tener en cuenta es que existen evidencias previas que demuestran que la expresión de caderina N en células de cáncer de colon puede inhibir la sobre-expresión de *ciclina D1* (*Cycl1*) de estas células [64].

En el desarrollo tumoral, la mayoría de los estudios han aportado evidencias de la expresión disminuida de la caderina E en carcinomas, que suele ir acompañada de la expresión *de novo* del gen *caderina N* en algunos cánceres humanos [65-68]. Estas observaciones han llevado a proponer la existencia de un proceso conocido como “Cadherin Switch” (“intercambio de caderinas”), de modo que la pérdida de caderina E epitelial va seguida de la sobre-expresión de la caderina N mesenquimal que potencia las capacidades de motilidad e invasividad de las células tumorales [51, 69].

Algunos estudios realizados en patologías hematológicas humanas han puesto de manifiesto una reducción significativa o la ausencia de expresión de *caderina E* en

distintos tipos de leucemias [49] y en pacientes con LH [50], sugiriendo que este gen se comporta como un gen supresor de tumores. En cuanto a la *caderina N*, su naturaleza apunta más bien hacia un comportamiento oncogénico, dado que su expresión ha sido detectada en algunos linfomas T [70] y que su expresión aumenta en los procesos de “intercambio de caderinas”. Sin embargo, nadie había aportado aún datos sobre el papel de ambas caderinas en los linfomas linfoblásticos de células T.

Debido a que el análisis histológico de los linfomas tímicos murinos, inducidos mediante tratamiento con radiación γ reveló una aparente pérdida de adhesión intercelular (**Figura R1-4B**), se analizó la expresión de los genes *Cdh1* y *Cdh2* (*caderinas E* y *N* respectivamente) poniéndose de manifiesto una reducción significativa de sus niveles de *ARNm* (**Figura R2-2**). Por tanto, el comportamiento de ambos genes sería similar en estos linfomas, contraviniendo la hipótesis del “intercambio de caderinas” observado en tumores sólidos.

Para determinar los patrones de expresión tisular de estos genes en las muestras control y en los linfomas se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia (**Figura R2-7**). Pero en este caso solo se pudo estudiar la caderina E, porque no existía en los timos de ratón la suficiente cantidad de caderina N requerida para ser detectada mediante este procedimiento (**Figura R2-8**). Los resultados demostraron que la caderina E se expresa principalmente en las células estromáticas de los timos control, mientras que los timos de individuos que desarrollaron linfoma tímico presentaban acúmulos escasos de células positivas, confirmándose la disminución de la expresión de este gen que corre paralela a una acusada desorganización estructural como la que ya se apuntaba en el análisis histológico (**Figura R1-2**).

Por otro lado, en las muestras tímicas de individuos tratados con cuatro dosis de radiación sucesivas pero que no llegaron a desarrollar linfomas, los niveles de *Cdh1* y *Cdh2* analizados mediante *RT-PCR* cuantitativa en tiempo real no diferían significativamente de los de los timos control (**Figuras R2-9 y R2-10**). Sin embargo, la

distribución de la caderina E en las secciones de estas muestras se parecía más a la observada en la región medular de las muestras control por su aspecto homogéneo, aunque no se perciban las áreas bien definidas presentes en los timos de animales sin irradiar.

En las muestras de individuos expuestos a una única dosis de radiación, se observó una llamativa sobre-expresión de los niveles de *ARN* de ambos genes (**Figuras R2-9 y R2-10**), correlacionada con una intensa señal positiva en la corteza de estos timos.

Puesto que ambos genes tienden a disminuir en los linfomas, a mantenerse en los timos de ratones tratados que se resistieron al desarrollo tumoral, y a aumentar en la respuesta inmediata a la primera dosis de radiación, se podría inferir que la expresión de ambos genes forma parte de un mecanismo de defensa frente al desarrollo tumoral, y que ambos genes se comportan como supresores frente al desarrollo de este tipo de linfomas. Sin embargo, la ausencia de mutaciones puntuales en las secuencias codificantes de ambos genes los apartaría de la definición clásica de genes supresores [71].

La ausencia de mecanismos genéticos de inactivación en estos genes no parece una característica exclusiva de este tipo de linfomas. De hecho, en la mayoría de los tumores, las alteraciones genéticas del gen *caderina E* son infrecuentes, salvo en los carcinomas de mama lobulares y en los carcinomas gástricos difusos [55]. Los procesos epigenéticos relacionados con la hipermetilación de su región promotora parece el mecanismo usual para la inactivación de este gen en los tumores donde se ha visto implicado [52, 72]. Sin embargo, la inactivación de *caderina N* mediante procesos similares sólo ha sido descrita en células pancreáticas tumorales humanas [73].

Además, la radiación induce carcinogénesis no sólo mediante la producción de daños genéticos sino también mediante la inducción de efectos epigenéticos [36]. En concreto, la importancia del silenciamiento génico mediante hipermetilación de

promotores en linfomas tímicos inducidos con radiación- γ había sido ya constatada por nuestro equipo en el caso de los genes *p15* y *p16* [26, 27, 60].

Para identificar los mecanismos implicados en la disminución de la expresión de *Cdh1* y *Cdh2* se estudiaron los niveles de metilación de las islas CpG de sus promotores mediante MSP y análisis por secuenciación.

Nuestros resultados demuestran claramente que la inactivación transcripcional del gen *Cdh2* se debe a eventos de hipermetilación de su región promotora (**Figura R2-3**); mientras que solamente una fracción minoritaria de tumores (4 de 14) presentaba hipermetilación en el promotor del gen *Cdh1* (**Figura R2-4**). Por tanto, en este caso había que pensar en otros mecanismos epigenéticos alternativos, como los relacionados con la sobre-expresión de represores transcripcionales específicos [54, 72]. En este sentido el gen *Snail* parecía un buen represor candidato puesto que ya se había demostrado su capacidad de inactivar a *caderina E* en varios carcinomas mediante el reclutamiento de un complejo de acetilasas-histona para la deacetilación del promotor del gen [55]. Por este motivo, se estudió su patrón de expresión transcripcional, poniéndose de manifiesto su sobre-expresión significativa en tres casos en los que los niveles de ARN de *Cdh2* eran bajos y su promotor no estaba hipermetilado (**Figura R2-5**).

En resumen, las evidencias aportadas en esta tesis apoyan la hipótesis de que el silenciamiento epigenético de ambos genes podría favorecer la progresión hacia los estadios más avanzados de la linfomagénesis. Por otro, dado que los genes de las caderinas E y N se expresan esencialmente en la fracción de células estromáticas, se estarían aportando pruebas de alteraciones genéticas que no ocurren en las células tumorales *per se*, como eventos necesarios para la progresión tumoral.

2. Los tumores presentan alteraciones en la expresión de componentes de las vías de Wnt y Hedghog

2.1.- Alteraciones de la vía de Wnt en el desarrollo tumoral

El uso de *micromatrices* por otros autores, ha permitido la identificación de genes diana de la vía de Wnt en timocitos humanos $CD34^+$ que equivalen a los dobles negativos $DN1/DN2$ de ratón, tras someterlos a tratamientos específicos que activaban la ruta de Wnt [74]. Entre los genes diana de la vía de Wnt destacan *c-Myc* y *ciclinaD1* [99] que, como se ha dicho, aparecen sobre-expresados en la mayoría de nuestros linfomas [11, 30].

Se han descrito alteraciones en las vías de señalización de Wnt en distintos tipos de cánceres incluyendo algunos hematológicos [15]. Sin embargo existen datos aparentemente contradictorios. Así, por ejemplo, existen pruebas de que WNT5A podría inhibir la expresión de *ciclinaD1*, a través de la vía de señalización no canónica mediada por Ca^{2+} , regulando negativamente la proliferación de células B [75]. De hecho, los ratones hemicigóticos para *Wnt5a* desarrollan leucemias mieloides clonales y linfomas B al perder el alelo salvaje que les quedaba. Por tanto, *Wnt5a* podría estar funcionando en este caso como un gen supresor. Por el contrario, *Wnt4* parece funcionar como un factor de crecimiento en los timocitos DN, como se deduce también del análisis de ratones KO [15].

En nuestro caso, los linfomas linfoblásticos de tipo T inducidos con radiación y dentro del marco de alteraciones observadas (**Tabla R3**), llama poderosamente la atención la bajada significativa de expresión de *Wnt4* en el conjunto del timo (que sugiere un papel supresor contrario al postulado hasta la fecha). La sobre-expresión de *Wnt9a* en los timocitos de los linfomas T podría estar contribuyendo a la sobre-expresión de *c-Myc*, ya que se comportaría como oncogen. Resulta también interesante constatar la bajada significativa en los niveles de expresión del gen supresor *Apc* que

también estaría contribuyendo en esta misma línea. En la fracción estromática, las alteraciones más destacables serían la sobre-expresión del factor de transcripción *Fosll* y la disminución de *Aes*, que junto con los resultados histológicos sugieren la implicación del estroma en el desarrollo de estos linfomas.

2.2.- Alteraciones de la vía de Hh en el desarrollo tumoral

Se han descrito alteraciones en algunos miembros de la vía Hedghog en el desarrollo de algunos tipos de cánceres de cerebro, piel y músculo [76], gástricos [77], próstata [78], páncreas [79], mama [80] y hepatocarcinomas [81, 82]. En la mayoría de los casos se trata de mutaciones en el gen *PATCHED*, y en algún caso en *SMOOTHEDED* (*SMO*) [82-84]. En cuanto a los niveles de expresión existen datos contradictorios sobre el papel de los cambios de *Ptch* y *Smo* en diferentes tipos de tumores [85].

En nuestros tumores *Smo*, el único componente no redundante de esta vía, aparece sobre-expresado (**Tabla R3**). Se ha descrito que la falta de *Smo* podría repercutir en el desarrollo de los timocitos al provocar un aumento significativo de la apoptosis en la subpoblación de los timocitos *DN* (sobre todo *DN2* y *DN3*), y disminuir la proporción de *DN2* proliferantes. Por tanto se podría pensar que en nuestros tumores estuviese pasando todo lo contrario. Es decir, la sobre-expresión de *Smo* podría estar facilitando la supervivencia de los timocitos, colaborando así con la ruta de Wnt en la proliferación de los linfocitos T inmaduros.

3. El análisis de expresión en fracciones separadas de componentes de ambas vías demuestra la co-evolución de alteraciones en timocitos y estroma en los linfomas linfoblásticos

Se ha demostrado que determinadas moléculas son expresadas por el epitelio tímico, como las proteínas Shh y Wnt [14, 86]. Concretamente, en este estudio se corroboró la localización de E-caderina en la superficie de las células de la médula tímica (**Figura R2-7**).

El análisis de expresión mediante *RT-PCR* cuantitativa en tiempo real de los genes *Smo*, *Wnt4*, *Cdh1*, *Aes*, *Tcf7* y *Myc* en fracciones celulares de timos control (**Figura R3-1**) puso de manifiesto diferencias significativas entre los niveles de expresión de los genes *Cdh1*, *Cdh2* y *Wnt4* en las células estromáticas de timos control versus timocitos, por lo que la bajada de expresión observada en estos genes se podría atribuir esencialmente a su desregulación en células estromáticas. Este hecho tendría una especial trascendencia en el caso de *Wnt4*, cuya bajada de expresión (como se ha comentado) no dejaba de ser sorprendente si hubiese sido en los timocitos.

El análisis de estos 6 genes en las dos fracciones de los tumores (**Figura R3-3A y B**) puso de manifiesto que la desregulación génica ocurría en ambos tipos celulares, con comportamientos contrarios incluso en la misma fracción celular (**Tabla D1**). De hecho, la disminución de expresión de *Wnt4* en las células estromáticas de todos los linfomas y su sobre-expresión en los timocitos de un 30% de los linfomas podría sugerir papeles antagónicos en según qué tipo celular. Por tanto, se podría pensar que, en ocasiones, *Wnt4* se comportaría como oncogen en timocitos inmaduros tumorales.

A diferencia de los genes anteriores, la sobre-expresión de *Smo* y *c-Myc* sucede claramente en las dos fracciones celulares, y la situación se invierte en el caso de los genes *Aes* y *Tcf7* que ocurre esencialmente en los timocitos.

Gen	Células Estromáticas	Timocitos
<i>Smo</i>	* 70%	*20% ; * 50%
<i>Wnt4</i>	*100%	* 30%
<i>Cdh1</i>	*100%	*20% ; * 50%
<i>Aes</i>	*50% ; * 20%	*80%
<i>Tcf7</i>	*20% ; * 10%	*70%
<i>Myc</i>	* 70%	* 90%

Tabla D1. Resumen de las alteraciones génicas en fracciones celulares separadas de muestras de linfomas linfoblásticos. Las cifras en rojo indican el % de tumores con el gen sobre-expresado y las cifras en azul, el % de tumores con la expresión del gen correspondiente disminuida.

Estos resultados demuestran la necesidad de alteraciones tanto en las células tumorales *per se* como en las células estromáticas, y están en concordancia con los datos obtenidos del análisis histológico y de detección de apoptosis en esta última fracción celular. En este sentido, la pérdida de la integridad y la muerte por apoptosis de las células estromáticas alteraría las interacciones imprescindibles para el correcto mantenimiento de la homeostasis, de modo que los timocitos no recibirían las órdenes adecuadas para su diferenciación [87, 88] o su muerte [89-91].

CONCLUSIONES

1. El análisis histológico y citológico mediante citometría de flujo confirma que los linfomas tímicos inducidos con radiación γ responden a la categoría de linfomas linfoblásticos T, caracterizados por la proliferación de timocitos inmaduros dobles negativos (*DN*), simples positivos inmaduros (*ISP*) o dobles positivos (*DP*).

2. Aunque por tratarse de linfomas linfoblásticos se pudiera pensar que las células estromáticas deberían permanecer esencialmente inalteradas, se han constatado importantes alteraciones morfológicas, correspondientes con la ejecución de programas apoptóticos en este tipo de células, que conllevan pérdida de adhesión y, por tanto, de comunicación celular entre las mismas células estromáticas y con los timocitos.

3. El análisis detallado de los patrones de expresión génica de los genes de las caderinas E (*Cdh1*) y N (*Cdh2*) que se expresan esencialmente en las células estromáticas, demuestra la inactivación de ambos genes mediante procedimientos epigenéticos, contraviniendo la hipótesis del “intercambio de caderinas” sugerida en tumores sólidos y apoyando la importancia de alteraciones en el micro-ambiente tímico durante el desarrollo tumoral.

4. El análisis comparativo de los perfiles de expresión génica mediante *matrices* de los principales componentes de la vía de Wnt demostró una bajada significativa en la expresión de *Wnt4* (en la fracción estromática), y la sobreexpresión de *Wnt9a* (en los timocitos), que podría estar contribuyendo a la sobre-expresión del oncogen *c-Myc*. La bajada de expresión de los genes supresores *Apc* y *Aes* podría estar actuando en esta misma línea.

5. La sobre-expresión de *Smo*, el único componente no-redundante de la vía de Hedgehog, en las dos fracciones celulares podría estar facilitando la supervivencia de los linfocitos inmaduros, colaborando así con la ruta de Wnt.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

Para realizar este trabajo se han utilizado ratones de las cepas consanguíneas C57BL/6J y BALB/cJ obtenidos de Laboratorios Jackson.

Las tareas de mantenimiento, cruce y chequeo diario fueron realizadas en el Animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la supervisión del Dr. Javier Palacín.

En la manipulación y sacrificio de animales, se siguieron las consideraciones éticas dispuestas por la Comisión Europea (Directiva 86/609/CEE), para la utilización de animales de laboratorio.

2. Tratamientos con radiación γ

Los tratamientos con radiación γ utilizados para la obtención de muestras fueron aplicados a ratones de 4-5 semanas de edad.

El primer tratamiento consistió, esencialmente, en la irradiación semanal de cuerpo completo con dosis fraccionadas de 1,75 Gy, a partir de una fuente de ^{137}Cs , durante cuatro semanas [39]. Tras la última irradiación se hizo un cuidadoso seguimiento de los ratones durante un periodo de latencia comprendido entre las semanas 12 y 25, de modo que la aparición y evolución de síntomas característicos del desarrollo de linfomas tímicos (aumento del tamaño del bazo y/o de nódulos linfoides, postura encorvada, respiración entrecortada, pelaje alborotado o letargia) marcaba el sacrificio de los animales con tumores, mientras que los individuos que sobrevivían (sin haber desarrollado los síntomas tumorales) fueron sacrificados al final del periodo de latencia.

El segundo tratamiento aplicando a los ratones una única dosis de 1,75 Gy, sacrificándolos tras 24 horas.

De este modo, se han utilizado cuatro grupos de muestras en este trabajo:

1) Doce linfomas tímicos a partir de ratones de la cepa C57BL/6J y catorce a partir de la F1 del cruce de hembras y machos de las cepas C57BL/6J y BALB/cJ.

2) Once ratones que, tras ser irradiados, no desarrollaron linfoma tímico.

La presencia/ausencia definitiva de linfoma tímico se decidió en base al peso de la glándula y a criterios citológicos e histológicos [38].

3) Nueve ratones tratados con dosis única.

4) Catorce animales de la cepa C57BL/6J y tres híbridos F1 (C57BL/6Jx BALB/cJ) controles, es decir, ratones de la misma edad que no fueron irradiados.

3. Histología

Los timos completos pertenecientes a tres individuos control, a tres que desarrollaron linfomas tímicos, a tres individuos sometidos a tratamiento con dosis de radiación fraccionada y a cinco de animales irradiados con dosis única, se fijaron en formaldehído tamponado con solución salina de fosfato (*PBS*: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) al 3,7%, inmediatamente después de su extracción y se mantuvieron a 4°C un máximo de 72 horas.

La inclusión en parafina de los tejidos y la tinción con Hematoxilina&Eosina de las secciones se realizaron siguiendo protocolos convencionales.

4. Separación de fracciones celulares

Las muestras tímicas correspondientes a ocho individuos control, a diez ratones que desarrollaron linfoma tímico tras el tratamiento con dosis fraccionadas de radiación, a cinco animales que no desarrollaron linfoma en estas condiciones y a tres ratones irradiados con una única dosis de radiación, cuidadosamente recogidas, se disgregaron mecánicamente con el émbolo de una jeringa estéril sobre una membrana de nylon (BD Falcon Cell Strainer), haciendo pasar la fracción de células enriquecidas en timocitos a 4 ml de *PBS*.

La fracción celular enriquecida en células estromáticas se aisló, entonces de acuerdo al método descrito por Gray et al 2002 [5], mediante digestión enzimática (colagenasa D 0,125% (p/v) con DNasa I 0,1% (p/v) (ambos productos de Roche) en 5 ml de *RPMI*-1640 (Gibco)).

Los timocitos se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech) según instrucciones del fabricante.

5. Citometría de flujo

Los timos extraídos de ratones control fueron disgregados inmediatamente, procediéndose a la separación de las fracciones celulares tal y como se detalla en el apartado anterior.

Las tinciones se realizaron en $0,5 \times 10^6$ células en el caso de los timocitos y en 3×10^6 células en el caso de células estromáticas.

Después de lavarlas mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C en solución de tinción (*PBS* 1X, *FBS* descomplementado 1%, *BSA* 1% (p/v), 0,01% Azida sódica), las células se incubaron durante 20 minutos en la oscuridad a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes y los controles de isotipo adecuados (**Tabla I**). Posteriormente se lavaron en solución de tinción, de nuevo mediante centrifugación, en las mismas condiciones anteriores.

Las muestras se procesaron en un citómetro de flujo Coulter EPIS-XL.

6. Aislamiento de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas

Para la extracción de *ADN* se utilizó DNAzolTM (Progenetics), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Posteriormente se cuantificó la concentración en espectrofotómetro (GeneQuant pro GE-Amersham).

El aislamiento de *ARN* se realizó utilizando TripureTM Isolation Reagent (Roche), siguiendo las especificaciones del fabricante. Mediante espectrofotometría (Nanodrop

ND1000, Nanodrop Technologies) se determinaron la concentración de las muestras y su pureza (ratio $A_{260}:A_{280} \geq 1,8$). Además, se comprobó la presencia de las dos bandas de ARN ribosómico de 28S y 18S, bien definidas, con ratio 2:1, en geles de agarosa con formaldehído, que asegura la buena calidad del ácido nucléico extraído.

Los extractos de proteínas se obtuvieron mediante lisis celular en solución *RIPA* (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, deoxicolato sódico 0.5%, SDS-sodium dodecyl sulfate-0.1% y Triton X-100). En el caso de las caderinas, la solución de lisis se complementó con CaCl₂ 10 mM. En cualquier caso, se añadieron las cantidades recomendadas de *PMSF* 1 mM (Sigma), inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche), y se cuantificaron mediante método colorimétrico *BCA* (Pierce).

7. PCR

Se utilizaron 8 parejas de oligonucleótidos (**Tabla II**), diseñados con el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) sobre las secuencias de *Cdh1* (número de acceso a *GenBank*: X60961) y *Cdh2* (número de acceso a *GenBank*: NM_007664). Para la detección de pérdidas de heterocigosidad se utilizaron los primers del marcador polimórfico D18Mit21 (<http://www.informatics.jax.org>).

Las amplificaciones del ADN genómico se realizaron en un volumen de 25 µl, con unas concentraciones finales de Tris-HCl 10 mM, pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5mM, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (*dATP*, *dCTP*, *dGTP* y *dTTP*), 0,2 µM del oligonucleótido correspondiente y 1U de Tgo polimerasa (Roche).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador (MJ Research, Inc.), a partir de 200 ng de ADN bajo las siguientes condiciones: un primer paso de 10 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a T^a de anillamiento óptima de cada pareja de cebadores y 2 minutos a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de *PCR* se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante para la visualización de las bandas. En algunos casos, los productos fueron caracterizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 12%, durante 20 horas a 7W constantes de potencia y fueron revelados mediante tinción argéntica.

8. SSCP

Los fragmentos amplificados por *PCR* se analizaron mediante *SSCP* (de sus siglas en inglés, *single strand conformation polymorphism*). Para ello, las muestras se mezclaron (1:1) con tampón de carga (Formamida 95%, azul de bromofenol 0,05% (p/v), xilencianol B 0,05% (p/v), *EDTA* 20mM, NaOH 10mM y *SDS* 0,1%) y se desnaturalizaron durante 10 minutos a 90°C.

Los geles no desnaturalizantes se prepararon con “MDE Gel Solution” (BMA products), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La electroforesis se llevó a cabo durante 15 horas a 7W constantes de potencia y el revelado se realizó mediante tinción argéntica.

9. PCR específica de metilación (MSP)

Las islas CpG fueron identificadas utilizando el programa CpGPlot (EMBOSS: <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/cpgplot.html>) en las secuencias promotoras publicadas de los genes *Cdh1* (número de acceso a *GenBank*: X60961) y *Cdh2* (*Ensembl Mouse Genome* ENSMUSG00000024304).

El ADN, asilado según se mencionó en el apartado 6, fue modificado por tratamiento con bisulfito [92], que provoca el cambio a uracilos, mediante deaminación, de los residuos de citosinas que carecen de grupo metilo. Después, fue purificado siguiendo el método “Wizard DNA Clean-up system” (Promega).

Las amplificaciones por *PCR* se llevaron a cabo en un termociclador “PTC-100 Programmable Thermal Controller” (MJ Research, Inc.), utilizando los oligonucleótidos

detallados en la **Tabla III** y la polimerasa “FastStart Taq DNA Polymerase” (Roche). Las condiciones de amplificación fueron: 12 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Se utilizaron como controles negativo y positivo de metilación, *ADN* aislado de timo normal sin tratar y tratado con *SssI* metil-transferasa, respectivamente.

Los productos de *PCR* fueron cargados en un gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio.

Los sitios CpG metilados fueron confirmados mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos especificados en la **Tabla III**.

10. Secuenciación de ADN

En determinados casos se confirmaron las secuencias definidas por las parejas de cebadores correspondientes utilizando el sistema ABI Prism (Applied Biosystems) de terminadores fluorescentes Big DyeTM y el aparato de electroforesis multicapilar ABI3730 del *CNIO*.

11. Matrices (Arrays) de ADNc

Las células estromáticas y los timocitos de tres timos controles y de tres linfomas tímicos se lisaron con Tripure. Después de homogeneizar las muestras y realizar la extracción orgánica con cloroformo, se añadió un volumen de etanol 70% a las fases incoloras que, sin mezclar, se cargaron en columnas del “kit RNeasy midi” (Qiagen). Para el aislamiento y purificación del *ARN* se siguieron las instrucciones del fabricante.

La síntesis y la reacción de marcaje de las sondas con *dUTP*-Biotina se llevó a cabo en el termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.), utilizando el “kit AmpoLabeling-LPR” (SuperArray) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las membranas de nylon del *kit* “GEArray Q Series Kit Mouse Wnt Signaling Pathway” (SuperArray) se prehibridaron con la solución adecuada durante toda la noche a 60°C; después se incubaron con las sondas correspondientes en las mismas condiciones anteriores, y se revelaron utilizando el *kit* de quimioluminiscencia recomendado (SuperArray).

Los datos fueron analizados con el programa “GEArrayAnalyzer” (SuperArray) y la verificación de los resultados de la matriz se realizó mediante el análisis de expresión individual por *RT-PCR* Cuantitativa en tiempo real (*LightCycler*) (ver apartado siguiente) de algunos genes escogidos (*Aes*, *Apc*, *Dvl3*, *Tcf7*).

12. *RT-PCR* cuantitativa en tiempo real (*LightCycler*)

Los ensayos de cuantificación de los genes *c-Myc*, *caderinas E* y *N* y *Snail* se realizaron mediante *RT-PCR* en tiempo real, con la tecnología *LightCycler* (Roche Diagnostics) y el método basado en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (*FRET*, de sus siglas en inglés). El gen de ratón de la cadena 5 β de la tubulina (*Tubb5*) (<http://www.informatics.jax.org>) fue utilizado como control interno de amplificación y de calidad del *ARN*.

La identificación de los productos de *PCR* y su cuantificación se basó en el uso de sondas de hibridación específicas consistentes en dos oligonucleótidos diferentes, uno marcado con fluoresceína en el extremo 3' (fluoróforo donador) y el otro marcado en el extremo 5' con “*LightCycler-Red640*” o el “*LightCycler-Red705*” (fluoróforos aceptores). Las sondas de hibridación fueron diseñadas por TibMolBiol.

Las reacciones de *RT-PCR* se realizaron en muestras de timo total y en muestras de fracciones celulares, utilizando el *kit* para *RT-PCR* en un solo paso “*LightCycler-RNA Master Hybridization Probes*” (Roche Molecular Biochemicals). Se utilizaron 200 ng de *ARN* total para generar el *ADNc* en cada reacción, así como $\text{Mn}(\text{Oac})_2$ 3.25 mM, 0.5 μM de cada primer, 0.2 μM de cada sonda de hibridación y la mezcla 1X del *kit* ‘*LC RNA Master Hybridization Probes*’. Los *ADNcs* de cada gen y del gen *Tubb5* fueron

coamplificados utilizando los cebadores descritos en la **Tabla IV**, según las siguientes condiciones: 2 minutos a 95°C y 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 15 segundos a 72°C (en este paso se tomaban las medidas).

Para los genes *Smo*, *Wnt4* y *Aes* (*Groucho*), *Apc*, *Dvl3* y *Tcf7* se realizó la *RT-PCR* utilizando también la tecnología *LightCycler*, pero utilizando como método de detección el marcaje con *SYBR Green*. En este caso se prepararon dos mezclas de reacción diferentes: una para el gen diana y otra para el gen de referencia, *G6PD* (“Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase”). Ambas incluían $\text{Mn}(\text{Oac})_2$ 3.25 mM, 0.3 μM de cada primer y la mezcla 1X del *kit* “LC RNA Master SYBR Green I” (Roche Molecular Biochemicals). Las condiciones de amplificación fueron las mismas que en el caso de la utilización de sondas, al igual que la cantidad de *ARN* total de partida (200 ng). Los cebadores empleados se detallan en la **Tabla V**.

El nivel de expresión de los genes se calculó, en cada muestra, con el método de cuantificación relativa normalizada del calibrador del software “*LightCycler Relative Quantification*” (Roche Molecular Biochemicals).

13. Western Blot

Las electroforesis se realizaron en geles de acrilamida/bisacrilamida en condiciones desnaturizantes (*SDS-PAGE*) al 8%. En el caso de las caderinas se cargó una cantidad de proteína total de 35 μg ; y para el análisis de *PARP* se cargaron 65 μg .

La transferencia a membranas de nitrocelulosa pura (Bio-Rad) se llevó a cabo durante 1 hora 30 minutos a 4°C, y se comprobó mediante tinción con rojo *Ponceau*. Después se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% en *TBS* (TrisHCl 10 mM, pH8; NaCl 150 mM)-Tween 0,1%.

La incubación con los anticuerpos primarios (ver **TABLA I**) se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche. Tras 3 lavados con *TBS*-Tween 0,1% de 5 minutos a temperatura ambiente, se incubó con los secundarios apropiados acoplados a peroxidasa (ver **TABLA I**). Posteriormente las membranas se lavaron con *TBS*-Tween 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente tres veces y se incubaron con “Lumi-LightPLUS Western Blotting Substrate” (Roche) para su revelado.

Se utilizó el anticuerpo anti β -actina de ratón (Sigma) como control de carga. Y como controles positivos para las caderinas E y N se cargaron extractos de proteínas de células HaCaT y de cerebro, respectivamente.

Las cantidades de proteínas correspondientes fueron cuantificadas mediante densitometría utilizando el programa Tina 2.0.

14. Inmunofluorescencia

Las secciones de 2 μ m en portaobjetos de polilisina (Menzel-Glaser) de los diferentes grupos de muestras se obtuvieron mediante cortes seriados en microtomo Reichert jun.

La desparafinación se realizó durante toda la noche a 60°C y después durante 30 minutos en xilol. Posteriormente se hidrataron mediante pases sucesivos en alcoholes de gradación decreciente hasta H₂O destilada. Se lavaron en *PBS* durante 5 minutos.

El desenmascaramiento de antígenos se llevó a cabo mediante digestión enzimática con proteinasa K (Roche) (0,01 mg/ml) 15 minutos a 37°C. Tras dos lavados de 5 minutos en H₂O destilada y en *PBS*, se procedió a hervir las muestras en solución citrato (ácido cítrico 1,8mM, citrato de sodio 8,6mM) en dos pasos de 5 minutos en microondas a potencia máxima. Después de atemperar durante 20 minutos se lavaron las muestras 5 minutos en H₂O destilada y en *PBS*.

Para eliminar la autofluorescencia, las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con cloruro amónico 50 mM. Las muestras se lavaron durante 5 minutos con *PBS* y 10 minutos con *PBS*- Tritón X-100 0,1%.

Tras bloquear las secciones 30 minutos a 37°C con solución de bloqueo (Zymed Laboratories Inc.) en cámara húmeda, se incubaron con anti caderina E de ratón (1:50), durante 1 hora 30 minutos a 37°C. Después de lavar 15 minutos en *PBS*, se incubó el anticuerpo secundario Alexa 488 (1:200) durante 1 hora a 37°C. Las muestras se lavaron, de nuevo en *PBS* durante 15 minutos y se contratiñeron con *DAPI* (Roche) durante un minuto. Tras lavar en las mismas condiciones anteriores, las muestras se montaron con “Vectashield” (Vector Laboratories Inc.) y se sellaron con laca.

Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio (Olympus BX61) equipado con una lámpara de mercurio HBO de 100 W y acoplado a una cámara digital Olympus DP70 para la captura de imágenes. Los filtros utilizados fueron el ultravioleta para *DAPI* (UV, filtro de excitación BP 360-370 y filtro de barrera BA 420) y azul para el Alexa (filtro de excitación BP 460-490 y filtro de barrera BA 520IF).

15. Inmunoprecipitación

Los extractos proteicos de seis timos normales se sometieron a inmunoprecipitación para las caderinas E y N (tres timos por cada proteína), utilizando proteína G-Sefarosa (Sigma).

Por un lado, los extractos de timo total se incubaron con 20 µl de resina durante una hora a 4°C con rotación. Después de un pulso en centrífuga refrigerada se reservaron los sobrenadantes a los que se añadió *PMSF* 1mM.

En las mismas condiciones, se mezclaron las inmunoglobulinas contenidas en suero de ratón (cedido por la Dra. María Luisa Toribio), con la misma cantidad anteriormente mencionada de sefarosa (20 µl por punto de inmunoprecipitación). Tras un pulso en centrífuga refrigerada, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con *PBS* 1X frío, dos veces. Después se resuspendió en solución de lisis.

Los sobrenadantes tratados se incubaron con la resina bloqueada contra uniones inespecíficas durante tres horas a 4°C con rotación. Después de un pulso, los precipitados se lavaron tres veces en las mismas condiciones de lavado mencionadas

anteriormente y se guardaron como controles; los sobrenadantes se centrifugaron por separado a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se transfirieron a tubos nuevos, descartando los precipitados.

Por otro lado, las cantidades adecuadas de anticuerpos contra estas caderinas se incubaron en 1 ml de *PBS* 1X con 20 µl de resina por punto de inmunoprecipitación, durante toda la noche a 4°C con rotación. Tras un pulso en centrífuga refrigerada, se descartaron los sobrenadantes y se lavaron los precipitados con *PBS* 1X frío dos veces. La proteína G-Sefarosa precipitada se resuspendió en el volumen adecuado de solución de lisis.

Los extractos tratados se mezclaron con 50-100 µl de resina unida a los anticuerpos contra las caderinas E y N durante toda la noche a 4°C con rotación. Después de un pulso se descartaron los sobrenadantes y se lavaron los precipitados en las mismas condiciones anteriores, para almacenarlos hasta analizarlos mediante Western Blot.

Se utilizó una muestra de cerebro como control positivo para caderina N.

16. Análisis estadístico

Para comprobar que las variables seguían una distribución normal se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y para la prueba de la normalidad de la varianza se utilizó el estadístico de Levene.

Las herramientas en la comparación de medias fueron el análisis de la varianza (ANOVA) con comparación de Tukey posterior en el caso de comparar varios grupos muestrales o *t* de Student cuando la comparación se realizaba entre dos grupos de muestras diferentes. Se utilizó el programa SPSS (SPSS Inc., version 14.0) para Windows.

Tabla I. Anticuerpos primarios y secundarios.

Especificidad	Isotipo	Conjugado	Uso	Fuente
<i>CD45</i> ratón	IgG 2aK ratón	Cy	Citometría	Becton Dickinson
<i>IgG 2a_K</i> ratón	-	Cy	Citometría	Becton Dickinson
<i>CD3</i> ratón	IgG1K hamster	FITC ó PE	Citometría	Becton Dickinson
<i>IgG1_K</i> Hamster	-	FITC ó PE	Citometría	Becton Dickinson
<i>CD4</i> ratón	IgG2aK rata	FITC	Citometría	Becton Dickinson
<i>CD8</i> ratón	IgG2aK rata	FITC	Citometría	Becton Dickinson
<i>CD8a</i> ratón	IgG2aK rata	PE	Citometría	Becton Dickinson
<i>IgG2a_K</i>	-	FITC ó PE	Citometría	Becton Dickinson
<i>E-caderina</i> ratón	Rata	-	WB	Dra. A. Cano
		-	IF	Becton Dickinson
<i>N-caderina</i> ratón	Ratón	-	WB	Zymed Laboratories Inc.,
<i>PARP humano</i>	Ratón	-	WB	AbD Serotec
<i>β-actina</i> ratón	Ratón	-	WB	Sigma
<i>IgG</i> ratón	Cabra	Peroxidasa	WB	Jackson
<i>IgG</i> rata	Cabra	Peroxidasa	WB	Pierce
		Alexa 448	IF	Molecular probes

Tabla II. Cebadores para PCR.

Gen	Región	Oligonucleótidos	Fragmento (pb)
<i>Cdh1</i>	Promotor	“Forward”: 5'-GAACGACCGTGAATAGGAA-3' “Reverse”: 5'-GGGCAGGAGTCTAGCAGAAG-3'	253
<i>Cdh2</i>	Exón 4	“Forward”: 5'-TAATGCAAAGGAACCATG-3' “Reverse”: 5'-GGAAAGGGTCCTCTGGAGTT-3'	141
	Exón 6	“Forward”: 5'-TTGAGAGCACATGCAGTGA-3' “Reverse”: 5'-TGATCCCTCTGGAACAGACC-3'	138
	Exón 13	“Forward”: 5'-TTCTGTGTAGGTGATTTTGC-3' “Reverse”: 5'-AAACACTCACTCAGCAGGAT-3'	168
	Exón 14	“Forward”: 5'-CCCTATCCAGTCCTTGTCTCA-3' “Reverse”: 5'-CACCACTCACCTGGTCTTCT-3'	160
	Exón 15	“Forward”: 5'-TGCTTGCAGGACTATGACTTG-3' “Reverse”: 5'-GGCCTTTCTGTACCTCATTAATG-3'	187
	Exón 16	“Forward”: 5'-CCTAACCCAGGGCCTTAAAG-3' “Reverse”: 5'-CGTACATGTCCGCCAGTTT-3'	200

Tabla III. Cebadores para estudio de metilación

Gen	Oligonucleótidos	Fragmento (pb)
<i>Cdh1</i> MSP No Metilado	“Forward” 5'-TTATTGGTGTGGGAGTTGTGGT-3' “Reverse” 5'-CACCAAACCTCCCATAACAAACCCA-3'	130
<i>Cdh1</i> MSP Metilado	“Forward” 5'-ATTGGTGTGGGAGTCGCGGC-3' “Reverse” 5'-AACTCCCATAACGAACCCGACA-3'	135
<i>Cdh2</i> MSP No Metilado	“Forward” 5'-TTTGTGAGAGTGTTATTTGTTTAGT-3' “Reverse” 5'-ACACATATACATATATACAAACCAC-3'	120
<i>Cdh2</i> MSP Metilado	“Forward” 5'-CGTGAGAGCGTTATTCGTTTAGC-3' “Reverse” 5'-GCGTATACGTATATACGAACCGC-3'	121
<i>Cdh1</i> Secuenciación	“Forward” 5'-GTTAGAGTATAGTTAGGTTAGGA-3' “Reverse” 5'-CTACTACACCTAACTCCCA-3'	372
<i>Cdh2</i> Secuenciación	“Forward” 5'-AGGGAAGGGAAAAGYGGGGGTT-3' “Reverse” 5'-ACCCCCTTCTCCRCTACTCTA-3'	381

Tabla IV. Cebadores y Sondas para RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real

Gen	Oligonucleótidos	Sondas de Hibridación
<i>c-Myc</i>	“Forward” 5'-CACCAGCAGCGACTCTGA-3' “Reverse” 5'-GTTGTGCTGGTGAGTGGAGA-3'	FL (fluoresceína) 5'-GCCACAGCAAACCTCCGCACA-3' LCRed640 5'-CCCACTGGTCCTCAAGAGGTGC-3'
<i>Cdh1</i>	“Forward” 5'-AAGTGACCGATGATGATGCC-3' “Reverse” 5'-CTTCATTACGTCTACACGT-3'	FL (fluoresceína) 5'-GTCACAGACCCACGACCAATGAT-3' LCRed640 5'-GCATTTTGAAAACAGCCAAGGGC-3'
<i>Cdh2</i>	“Forward” 5'-GTGGAGGCTTCTGGTGAAAT-3' “Reverse” 5'-CTGCTGGCTCGCTGCTT-3'	FL (fluoresceína) 5'-ATTGCAGTTGCTGAATTTACATTGAGA-3' LCRed640 5'-GGCTGTCCTTCGTGCACATCCTTC-3'
<i>Snai1</i>	“Forward” 5'-CTCTGAAGATGCACATCCGAA-3' “Reverse” 5'-ACTGGTATCTCTTCACATCCGAGT-3'	FL (fluoresceína) 5'-CGTCCGCACCCACACTGG-3' LCRed640 5'-GAGAAGCCATTCTCTGCTCCAC-3'
<i>Tubb5</i>	“Forward” 5'-TGGGACTATGGACTCCGTTTC-3' “Reverse” 5'-AAAGCCTTGCAGGCAATCA-3'	FL (fluoresceína) 5'-GGCCTTTAGCCCAGTTGTTGCCT-3' LCRed705 5'-CCCCAGACTGACCGAAAACGAAGTT-3'

Tabla V. Cebadores RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real

Gen	Oligonucleótidos	Fragmento (pb)
<i>Smo</i>	"Forward" 5'-CTTTGGCTTTGTGCTCATCA -3' "Reverse" 5'- CCAGACCCAGGTGCTCAT-3'	235
<i>Wnt4</i>	"Forward" 5'-GCGTAGCCTTCTCACAGTCC -3' "Reverse" 5'-ACGTCTTTACCTCGCAGGAG-3'	174
<i>Aes</i>	"Forward" 5'-AATTGTGAAGAGGCTGAATG -3' "Reverse" 5'-GCTGGGACAGCTGGTGAG-3'	164
<i>Apc</i>	"Forward" 5'-TTAAGACGGTATGCTGGAAT-3' "Reverse" 5'-GCTTTCACACTTCCAACCTC-3'	224
<i>Dvl3</i>	"Forward" 5'-GTGGCTCAAGATTACCATTG -3' "Reverse" 5'-GGTCGCCAAAGATGTAGTAG-3'	194
<i>Tcf7</i>	"Forward" 5'- GCGGATATAGACAGCACTTC-3' "Reverse" 5'-TCTTAGCCTCCTTCTCTGC-3'	219

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Brivanlou, A.H. and J.E. Darnell, Jr., *Signal transduction and the control of gene expression*. Science, 2002. **295**(5556): p. 813-8.
3. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
4. Lund, A.H. and M. van Lohuizen, *Epigenetics and cancer*. Genes Dev, 2004. **18**(19): p. 2315-35.
5. Gray, D.H., A.P. Chidgey, and R.L. Boyd, *Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry*. J Immunol Methods, 2002. **260**(1-2): p. 15-28.
6. Rodewald, H.R., *Immunology: a second chance for the thymus*. Nature, 2006. **441**(7096): p. 942-3.
7. Anderson, G. and E.J. Jenkinson, *Lymphostromal interactions in thymic development and function*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 31-40.
8. Zuniga-Pflucker, J.C., *T-cell development made simple*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 67-72.
9. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
10. Jenkinson, E.J., et al., *The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch?* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 551-5.
11. Lopez-Nieva, P., J. Santos, and J. Fernandez-Piqueras, *Defective expression of Notch1 and Notch2 in connection to alterations of c-Myc and Ikaros in gamma-radiation-induced mouse thymic lymphomas*. Carcinogenesis, 2004. **25**(7): p. 1299-304.
12. Allman, D., et al., *Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 168-74.
13. Lepault, F. and I.L. Weissman, *An in vivo assay for thymus-homing bone marrow cells*. Nature, 1981. **293**(5828): p. 151-4.
14. El Andaloussi, A., et al., *Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 418-26.
15. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-80.
16. Staal, F.J., et al., *Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription*. Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 285-93.
17. Mulroy, T., et al., *Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity*. Eur J Immunol, 2002. **32**(4): p. 967-71.
18. Staal, F.J. and H.C. Clevers, *WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): p. 21-30.
19. Balciunaite, G., et al., *Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1102-8.

20. Gounari, F., et al., *Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 863-9.
21. Cobas, M., et al., *Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis*. J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 221-9.
22. Xu, Y., et al., *Deletion of beta-catenin impairs T cell development*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1177-82.
23. Lee, M.G., et al., *Expression of the homotypic adhesion molecule E-cadherin by immature murine thymocytes and thymic epithelial cells*. J Immunol, 1994. **152**(12): p. 5653-9.
24. Muller, K.M., et al., *Involvement of E-cadherin in thymus organogenesis and thymocyte maturation*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 257-64.
25. Korswagen, H.C., M.A. Herman, and H.C. Clevers, *Distinct beta-catenins mediate adhesion and signalling functions in C. elegans*. Nature, 2000. **406**(6795): p. 527-32.
26. Malumbres, M., et al., *Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4b by deletion and de novo methylation with independence of p16INK4a alterations in murine primary T-cell lymphomas*. Oncogene, 1997. **14**(11): p. 1361-70.
27. Malumbres, M., et al., *Hypermethylation of the cell cycle inhibitor p15INK4b 3'-untranslated region interferes with its transcriptional regulation in primary lymphomas*. Oncogene, 1999. **18**(2): p. 385-96.
28. Herranz, M., et al., *Mouse p73 gene maps to the distal part of chromosome 4 and might be involved in the progression of gamma-radiation-induced T-cell lymphomas*. Cancer Res, 1999. **59**(9): p. 2068-71.
29. Herranz, M., et al., *Allelic losses and genetic instabilities of PTEN and p73 in non-Hodgkin lymphomas*. Leukemia, 2000. **14**(7): p. 1325-7.
30. Perez de Castro, I.P., et al., *Cooperative alterations of Rb pathway regulators in mouse primary T cell lymphomas*. Carcinogenesis, 1999. **20**(9): p. 1675-82.
31. Villa-Morales, M., J. Santos, and J. Fernandez-Piqueras, *Functional Fas (Cd95/Apo-1) promoter polymorphisms in inbred mouse strains exhibiting different susceptibility to gamma-radiation-induced thymic lymphoma*. Oncogene, 2006. **25**(14): p. 2022-9.
32. De la Cueva, E., et al., *Tumorigenic activity of p21Waf1/Cip1 in thymic lymphoma*. Oncogene, 2006. **25**(29): p. 4128-32.
33. McMorrow, L.E., E.W. Newcomb, and A. Pellicer, *Identification of a specific marker chromosome early in tumor development in gamma-irradiated C57BL/6J mice*. Leukemia, 1988. **2**(2): p. 115-9.
34. Melendez, B., J. Santos, and J. Fernandez-Piqueras, *Loss of heterozygosity at the proximal-mid part of mouse chromosome 4 defines two novel tumor suppressor gene loci in T-cell lymphomas*. Oncogene, 1999. **18**(28): p. 4166-9.
35. Yefenof, E., *Murine models of thymic lymphomas: premalignant scenarios amenable to prophylactic therapy*. Adv Immunol, 1999. **73**: p. 511-39.

36. Trosko, J.E., et al., *Low-dose ionizing radiation: induction of differential intracellular signalling possibly affecting intercellular communication*. Radiat Environ Biophys, 2005. **44**(1): p. 3-9.
37. Mothersill, C. and C. Seymour, *Radiation-induced bystander effects and adaptive responses--the Yin and Yang of low dose radiobiology?* Mutat Res, 2004. **568**(1): p. 121-8.
38. Newcomb, E.W., J.J. Steinberg, and A. Pellicer, *ras oncogenes and phenotypic staging in N-methylnitrosourea- and gamma-irradiation-induced thymic lymphomas in C57BL/6J mice*. Cancer Res, 1988. **48**(19): p. 5514-21.
39. Santos, J., et al., *A new locus for resistance to gamma-radiation-induced thymic lymphoma identified using inter-specific consomic and inter-specific recombinant congenic strains of mice*. Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6680-3.
40. Clarke, A.R., et al., *Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 849-52.
41. Dalmau, S.R., C.S. Freitas, and W. Savino, *Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice*. Blood, 1999. **93**(3): p. 974-90.
42. Fujikawa, K., et al., *Dose and dose-rate effects of X rays and fission neutrons on lymphocyte apoptosis in p53(+/+) and p53(-/-) mice*. J Radiat Res (Tokyo), 2000. **41**(2): p. 113-27.
43. Arudchelvan, Y., et al., *Ultrastructural alterations of the cortical epithelial cells of the irradiated and recovering rat thymus*. Arch Histol Cytol, 2005. **68**(3): p. 205-12.
44. Hacker, G., *The morphology of apoptosis*. Cell Tissue Res, 2000. **301**(1): p. 5-17.
45. Rello, S., et al., *Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments*. Apoptosis, 2005. **10**(1): p. 201-8.
46. Bosselut, R., *CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 529-40.
47. Palmer, E., *Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 383-91.
48. Werlen, G., et al., *Signaling life and death in the thymus: timing is everything*. Science, 2003. **299**(5614): p. 1859-63.
49. Melki, J.R., et al., *Hypermethylation of E-cadherin in leukemia*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3208-13.
50. Ohshima, K., et al., *Chromosome 16q deletion and loss of E-cadherin expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. Int J Cancer, 2001. **92**(5): p. 678-82.
51. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
52. Di Croce, L. and P.G. Pelicci, *Tumour-associated hypermethylation: silencing E-cadherin expression enhances invasion and metastasis*. Eur J Cancer, 2003. **39**(4): p. 413-4.

53. Tycko, B., *Epigenetic gene silencing in cancer*. J Clin Invest, 2000. **105**(4): p. 401-7.
54. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
55. Peinado, H., et al., *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 306-19.
56. Brathwaite, O., W. Bayona, and E.W. Newcomb, *p53 mutations in C57BL/6J murine thymic lymphomas induced by gamma-irradiation and N-methylnitrosourea*. Cancer Res, 1992. **52**(13): p. 3791-5.
57. Diamond, L.E., I. Guerrero, and A. Pellicer, *Concomitant K- and N-ras gene point mutations in clonal murine lymphoma*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(5): p. 2233-6.
58. Guerrero, I., et al., *Loss of the normal N-ras allele in a mouse thymic lymphoma induced by a chemical carcinogen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 7810-4.
59. Kakinuma, S., et al., *Spectrum of Znf1a1 (Ikaros) inactivation and its association with loss of heterozygosity in radiogenic T-cell lymphomas in susceptible B6C3F1 mice*. Radiat Res, 2002. **157**(3): p. 331-40.
60. Melendez, B., et al., *Characterization of the murine p19(ARF) promoter CpG island and its methylation pattern in primary lymphomas*. Carcinogenesis, 2000. **21**(4): p. 817-21.
61. Puch, S., et al., *N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 8): p. 1567-77.
62. Kutlesa, S., et al., *E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 23): p. 4505-15.
63. Anderson, G., et al., *MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus*. Nature, 1993. **362**(6415): p. 70-3.
64. Simcha, I., et al., *Cadherin sequences that inhibit beta-catenin signaling: a study in yeast and mammalian cells*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 1177-88.
65. Tomita, K., et al., *Cadherin switching in human prostate cancer progression*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3650-4.
66. Li, G. and M. Herlyn, *Dynamics of intercellular communication during melanoma development*. Mol Med Today, 2000. **6**(4): p. 163-9.
67. Hazan, R.B., et al., *N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma*. Cell Adhes Commun, 1997. **4**(6): p. 399-411.
68. Hazan, R.B., et al., *Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 779-90.

69. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 118-32.
70. Kawamura-Kodama, K., et al., *N-cadherin expressed on malignant T cell lymphoma cells is functional, and promotes heterotypic adhesion between the lymphoma cells and mesenchymal cells expressing N-cadherin*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(1): p. 62-6.
71. Cheng, C.W., et al., *Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene*. Oncogene, 2001. **20**(29): p. 3814-23.
72. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 365-75.
73. Hagihara, A., et al., *Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers*. Oncogene, 2004. **23**(53): p. 8705-10.
74. Staal, F.J., et al., *Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1099-108.
75. Liang, H., et al., *Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue*. Cancer Cell, 2003. **4**(5): p. 349-60.
76. Ruiz i Altaba, A., P. Sanchez, and N. Dahmane, *Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 361-72.
77. Katoh, Y. and M. Katoh, *Hedgehog signaling pathway and gastric cancer*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(10): p. 1050-4.
78. Karhadkar, S.S., et al., *Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis*. Nature, 2004. **431**(7009): p. 707-12.
79. Gao, J., et al., *Antisense Smo under the control of the PTCH1 promoter delivered by an adenoviral vector inhibits the growth of human pancreatic cancer*. Gene Ther, 2006. **13**(22): p. 1587-94.
80. Kubo, M., et al., *Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6071-4.
81. Huang, S., et al., *Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas*. Carcinogenesis, 2006. **27**(7): p. 1334-40.
82. Sicklick, J.K., et al., *Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis*. Carcinogenesis, 2006. **27**(4): p. 748-57.
83. Xie, J., et al., *Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 90-2.
84. Reifemberger, J., et al., *Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Cancer Res, 1998. **58**(9): p. 1798-803.
85. Katayam, M., et al., *Patched and smoothened mRNA expression in human astrocytic tumors inversely correlates with histological malignancy*. J Neurooncol, 2002. **59**(2): p. 107-15.

86. Pongracz, J., et al., *Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes*. Eur J Immunol, 2003. **33**(7): p. 1949-56.
87. Huiskamp, R., E. van Vliet, and W. van Ewijk, *Repopulation of the mouse thymus after sublethal fission neutron irradiation. II. Sequential changes in the thymic microenvironment*. J Immunol, 1985. **134**(4): p. 2170-8.
88. Huiskamp, R. and W. van Ewijk, *Repopulation of the mouse thymus after sublethal fission neutron irradiation. I. Sequential appearance of thymocyte subpopulations*. J Immunol, 1985. **134**(4): p. 2161-9.
89. Guy, R., et al., *CD44 co-stimulates apoptosis in thymic lymphomas and T cell hybridomas*. Cell Immunol, 2002. **216**(1-2): p. 82-92.
90. Camacho, I.A., et al., *Treatment of mice with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin leads to aryl hydrocarbon receptor-dependent nuclear translocation of NF-kappaB and expression of Fas ligand in thymic stromal cells and consequent apoptosis in T cells*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 90-103.
91. Schmitz, I., C. Meyer, and K. Schulze-Osthoff, *CD95 ligand mediates T-cell receptor-induced apoptosis of a CD4+ CD8+ double positive thymic lymphoma*. Oncogene, 2006. **25**(58): p. 7587-96.
92. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
93. María Matabuena, Javier Santos and José Fernández-Piqueras, *Evidence for a new tumour supresor gene locus for γ -radiation-induced thymic lymphoma located on the proximal part of mouse chromosome 18*. Rev Oncol (2004) **6**(2): p.90-93.
94. José Fernández-Piqueras and Javier Santos Hernández, *Tumor modifier genes*. Rev Oncol 2002. **4**(7): p.349-57.
95. Tesis Marta Cañamero Vaquero. *Linfomas tímicos murinos inducidos con radiaciones γ : Caracterización morfológica, IHQ, ultraestructural y genética*. 2001.
96. Fawcett 1988. 12ª Edición. Tratado de Histología. Interamericana McGraw Hill
97. American Cancer Society, 2006. www.cancer.org
98. Asociación Española Contra el Cáncer. www.todocancer.com
99. Web oficial de Wnt: <http://www.stanford.edu/~musse/wntwindow.html>
100. www.jax.org
101. www.riscrad.org

ABREVIATURAS

ADN/DNA: Ácido **D**esoxirribonucleico / **D**esoxi ribonucleic Acid
ADNc: Ácido **D**esoxirribonucleico **C**omplementario
ARN/RNA: Ácido **R**ibonucleico / **R**ibonucleic Acid
ARNm: Ácido **R**ibonucleico **m**ensajero
BCA: **B**icinchoninic Acid (Ácido bicinconínico)
BSA: **B**ovine **S**erum **A**lbumin (Albúmina de suero bovino)
CD4: Cluster of **D**ifferentiation 4 (Conglomerado de Diferenciación 4)
CEE: Comunidad **E**conómica **E**uropea
CNIO: Centro Nacional de **I**nvestigaciones **O**ncológicas
DAPI: 4',6-**D**iamidino-2-**p**henylindole
dATP: 2'-deoxy**a**denosine 5'-**t**riphosphate (desoxiadenosina trifosfato)
dCTP: 2'-deoxycytidine 5'-**t**riphosphate (desoxicitidina trifosfato)
dGTP: 2'-deoxy**g**uanosine 5'-**t**riphosphate (desoxiguanosina trifosfato)
dTTP: 2'-deoxy**t**hymidine 5'-**t**riphosphate (desoxitimidina trifosfato)
dUTP: 2'-deoxy**u**ridine 5'-**t**riphosphate (desoxiuridina trifosfato)
DN: **D**ouble **N**egative (Doble negativa)
DP: **D**ouble **P**ositive (Doble positiva)
EDTA: **E**thylene**d**iamine**t**etraacetic Acid (ácido etilendiaminotetraacético)
ETP: **E**arly **T**hymocyte **P**rogenitor (Progenitor de timocitos temprano)
FBS: **F**etal **B**ovine **S**erum (Suero fetal bovino)
FITC: **F**luorescein **I**sothiocy**a**nate (Isotiocianato de fluoresceína)
FRET: **F**luorescence-**r**esonance **E**nergy **T**ransfer (Transferencia de energía de resonancia fluorescente)
Gy: Greys
GSK3β: **G**lycogen **S**ynthase **K**inase **3β** (Kinasa glicógeno sintasa 3β)
HSC: **H**ematopoietic **S**tem **C**ell (Célula madre hematopoiética)
IgG: **I**mmunoglobulin **G** (Inmunoglobulina G)
LEF: **L**ymphocyte-**E**nhancer-binding **F**actor (Factor de union-potenciador de linfocitos)

LH: Linfoma **H**odgkin

LNH: Linfoma **N**o **H**odgkin

LOH: **L**oss of **H**eterozygosity (Pérdida de heterocigosidad)

LRP: **L**ipoproteins **R**eceptor-related **P**roteins (Proteínas asociadas al receptor de lipoproteínas)

MHC: **M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex (Complejo **P**rincipal de **H**istocompatibilidad)

MSP: **M**ethylation-specific **P**CR (PCR específica de metilación)

PARP: **P**oly(**A**DP-ribose) **P**olymerase (Polimerasa Poly(**A**DP-ribosa)

PBS: **P**hosphate **B**uffer **S**aline (Solución Salina de Fosfato)

PCR: **P**olymerase **C**hain **R**eaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PCP: **P**lanar **C**ell **P**olarity

PE: **P**hycoerythrin (Ficoeritrina)

PMSF: **P**henylmethylsulfonyl **F**luoride

REAL/WHO: **R**evised **E**uropen-**A**merican **L**ymphoma / **W**orld **H**ealth **O**rganization

RPMI: **R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute

RT-PCR: **R**everse **T**ranscriptase **P**olymerase **C**hain **R**eaction (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

SDS: **S**odium **D**odecyl **S**ulphate (Dodecil Sulfato Sódico)

SDS-PAGE: **SDS**-**P**olyacrylamide **G**el **E**lectrophoresis (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en SDS)

SP: **S**imple **P**ositive (Simple positiva)

SPI/ISP: **S**imple **P**ositiva **I**nmadura) **I**mmature **S**ingle **P**ositive

SSCP: **S**ingle **S**trand **C**onformation **P**olymorphism (Cambio de conformación de cadena sencilla)

TBS: **T**ris **B**uffer **S**aline (Solución salina de Tris)

TCF: **T** **C**ell **F**actor (Factor de célula T)

TCR: **T** **C**ell **R**eceptor (Receptor de célula T)

ANEXO

Evidence for a new tumour suppressor gene locus for γ -radiation-induced thymic lymphoma located on the proximal part of mouse chromosome 18

María Matabuena*, Javier Santos and José Fernández-Piqueras

Departamento de Biología, Laboratorio de Genética Molecular Humana, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Madrid, Spain

Introduction. Five distinct thymic lymphoma suppressor regions have been identified on chromosome 4 (TLSR 1-5), and one on chromosome 19 (TLSR 8) through detection of loss of heterozygosity (LOH). Additionally, the involvement of *p16/INK4a*, *p15/INK4b*, *p73*, *Pten* and *Fas* had been reported in the most advanced stages of thymic lymphomagenesis.

Material and methods. Advanced thymic lymphomas (n=110) induced by gamma-irradiation in F1 hybrids from a BALB/c and C57BL/6J cross were analysed using micro-satellite markers on chromosomes 13, 14 and 18.

Results. Of the 110 tumours, 15 (14.5%) exhibited allelic losses on chromosome 18 at *D18Mit21*. Comparative analyses revealed significant differences ($p<0.0001$) for this marker and led us to define a new critical region of LOH on the proximal part of mouse chromosome 18, and named as TLRS9 according to the Mouse Nomenclature Committee.

Conclusions. The proposed TLRS9 region is orthologous with 18q11 region, which is affected in various types of human cancers (Mitelman Database of Chromosome Aberrations in cancer (2002) Mitelman F, Johansson B and Mertens F (eds), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>), and contains *N-cadherin* as a possible candidate gene.

Key words: thymic lymphomas, γ -radiation, susceptibility, N-cadherin.

Matabuena M, Santos J, Fernández-Piqueras J. Evidence for a new tumour suppressor gene locus for γ -radiation-induced thymic lymphoma located on the proximal part of mouse chromosome 18. *Rev Oncol* 2004; 6 (2):

Evidencias de un nuevo locus supresor de linfomas tímicos inducidos con radiación- γ en la parte proximal del cromosoma 18 de ratón

Introducción. Hasta la fecha, han sido identificados 5 locus supresores de linfomas tímicos en el cromosoma 4 de ratón (TLRS 1-5) y uno en el cromosoma 19 (TLRS 8) mediante la detección de pérdidas de heterocigosidad (LOH). Además, se ha descrito la implicación de los genes *p16/INK4a*, *p15/INK4b*, *p73*, *Pten* y *Fas* en los estadios más avanzados de la linfomagénesis

Material y métodos. Se analizaron 110 linfomas tímicos inducidos mediante radiación gamma en híbridos F1 del cruzamiento entre las cepas BALB/c y C57BL/6J utilizando marcadores polimórficos de tipo microsatélite repartidos a lo largo de los cromosomas 13, 14 y 18 de ratón.

Resultados. Dieciséis de 110 linfomas tímicos (14,5%) mostraron pérdidas alélicas en el cromosoma 18 para el marcador *D18Mit21*. Un análisis comparativo reveló diferencias significativas ($p<0,0001$) para este marcador, por lo que se podría definir una nueva región de LOH en la parte proximal del cromosoma 18 de ratón denominada TLRS9 de acuerdo con el Comité de Nomenclatura del Ratón.

Conclusiones. La región TLRS9 propuesta es ortóloga de la región 18q11, que se ve afectada en numerosos tipos de cánceres humanos (Mitelman Database of Chromosome Aberrations in cancer (2002) Mitelman F, Johansson B and Mertens F (eds), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>), y contiene el gen N-caderina como posible candidato.

Palabras clave: linfomas tímicos, radiación-g, susceptibilidad, N-caderina.

Correspondence: María Matabuena.
Departamento de Biología.
Laboratorio de Genética Molecular Humana.
Facultad de Ciencias.
Universidad Autónoma de Madrid.
28049 Madrid. Spain.
E-mail: maria.matabuena@uam.es

Received 28 May 2003; Accepted 6 November 2003.

INTRODUCTION

Murine thymic lymphomas induced by g-radiation in F1 hybrids have proven to be an useful model organism in the searching of tumour suppressor genes through detection of loss of heterozygosity (LOH). Using (BALB/cJ x C57BL/6J)F1 and (RF/J x C57BL/6J)F1 hybrids, we identified 5 distinct thymic lymphoma suppressor regions on chromosome 4 (TLSR 1-5)¹⁻³ and one on chromosome 19 (TLSR 8)⁴. Additionally, we found evidence of the involvement of *p16/INK4a*, *p15/INK4b*, *p73*, *Pten* and *Fas* in the most advanced stages of thymic lymphomagenesis⁴⁻⁶. Other authors had also described allelic losses on chromosomes 12 (TLSR 6), 16 (TLSR 7) and 11⁷⁻¹⁰ in similar thymic lymphomas induced in different mouse strains (essentially BALB/c, and MSM).

In this paper an extension of our initial allelotype analysis in tumours induced by g-irradiation in (BALB/cJ x C57BL/6J)F1 hybrids, has allowed us to define a new critical LOH-region on chromosome 18

(TLSR9), centered at the D18Mit21 marker, which contains the *N-cadherin* as a possible candidate gene.

MATERIALS AND METHODS

Mice and induction of tumours

Reciprocal interstrain crosses, involving males and females from the strains BALB/cJ and C57BL/6J were made to generate F1 hybrid mice. Thymic lymphomas were induced by whole body g-radiation distributed in 4 weekly doses of 1,75 Gy, starting with 35-60-day-old mice. Thymic lymphoma development was observed in mice at weekly intervals beginning 12 weeks after g-irradiation and up to 26 weeks. Treated mice were sacrificed when they showed obvious signs of the disease, such as enlargement of spleen or lymph nodes detectable by palpation, hunched posture, shortness of breath, ruffled fur, or lethargy. Survivors were sacrificed at the end of the latency period (26 weeks). Thymus weight in excess of 100 mg at

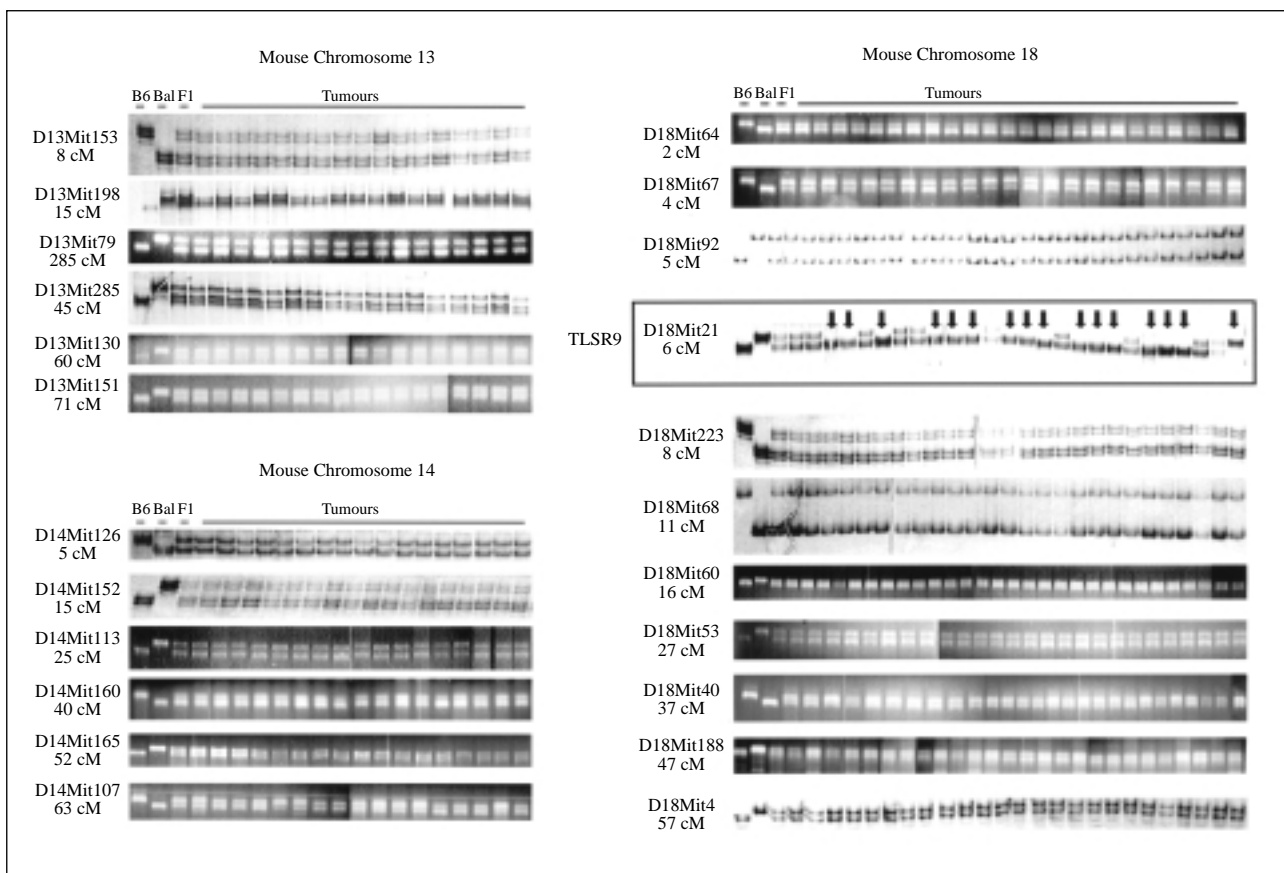


Fig. 1. Representative allelotype analysis of chromosomes 13(a), 14(b) and 18(c). The first three lanes on all panels represent control DNA samples from the parental strains C57BL/6J (B6), BALB/cJ (Bal) and their F1 hybrids (F1). The remaining lanes represent tumour DNA samples. D18Mit21 marker showed LOH in a significant fraction of the tumours (arrows) analysed.

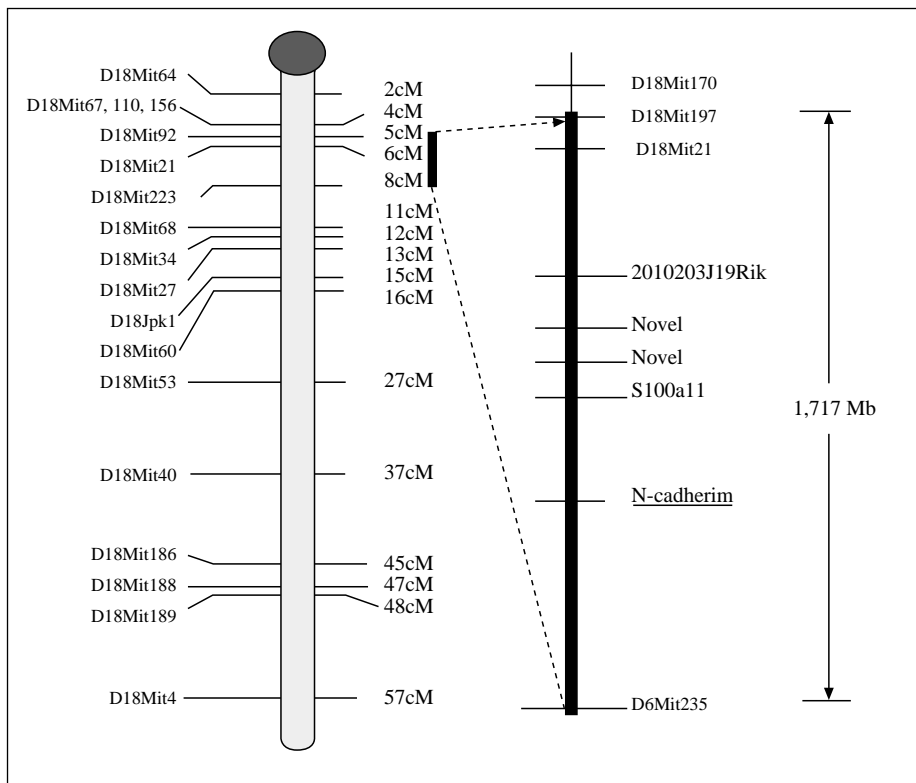


Fig. 2. Loss of heterozygosity (LOH) mapping of chromosome 18 in g-radiation induced thymic lymphoma. Order of and precise distances between the microsatellite markers used in the allelotype analyses are represented to the left of the chromosome 18. The black bar to the right of the chromosome 18 indicates the critical LOH region (TLSR9).

necropsy and serology of T-cell markers were used as criteria for the presence of thymic lymphoma in accordance with experiments previously described¹. All of 110 tumor samples analysed in this study were T-cell lymphomas in the most advanced stage of their development (frank lymphomas).

Polymorphic Markers

Allelotype analysis to detect LOH was performed on chromosome 13 with 6 polymorphic microsatellite markers spanning from 8 cM to 71 cM (D13Mit153, D13Mit198, D13Mit179, D13Mit285, D13Mit130 and D13Mit151), chromosome 14 with 7 microsatellite markers from 5 cM to 63 cM (D14Mit126, D14Mit152, D14Mit113, D14Mit193, D14Mit160, D14Mit165 and D14Mit107) and chromosome 18 using 20 polymorphic markers (figs. 1 and 2). All PCR primers were obtained from the Mouse Genome Database (<http://www.informatics.jax.org>).

PCR amplifications

DNA amplifications were performed in a volume of 25 μ l with a final concentration of 10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 0.2 μ M each of forward and reverse primers; and 1 U of Tth polymerase. Two hundred nanograms of genomic DNA as template were used in each PCR reaction. PCR were carried

out in a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.). PCR products were electrophoresed in agarose gels, 12% acrylamide TBE-buffered, or 6% denaturing acrylamide TBE-buffered gels, and detected by direct ethidium bromide staining (agarose gels) or by silver staining (acrylamide gels).

RESULTS

In this paper we have analysed 110 advanced thymic lymphomas induced in F1 hybrids between BALB/c and C57BL/6J, using microsatellite markers throughout chromosomes 13, 14 and 18. No LOH were found on chromosomes 13 and 14, but 16 out of 110 tumours (14.5%) exhibited allelic losses on chromosome 18 at *D18Mit21* (6 cM), exclusively. Interestingly, 15 out of 16 LOH involved to the BALB/cJ allele (fig. 1). A comparative analysis between allelic losses occurring on chromosome 18 and those appearing on other chromosomes, using the markers described in Santos et al^{1,2,4}, revealed significant differences ($p < 0.0001$) for D18Mit21, and led us to define a new critical region of LOH on the proximal part of mouse chromosome 18 named as TLRS9 according to the mouse nomenclature committee (fig. 2).

DISCUSSION

The proposed TLRS9 region is clearly favoured by the comparison between mouse and human genomes

(Ensembl Human Genome Server, Synteny View) since there is a conserved synteny between TLSR9 and 18q11, a region which is frequently affected by recurrent translocations and deletions in various types of cancers (Mitelman Database of Chromosome Aberrations in cancer (2002) Mitelman F, Johansson B and Mertens F (eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>).

Using the data provided by the Project Ensembl of the Sanger Centre and European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ensembl.org>), the LOH region expands over 1.717 Mb length, and contains three Ensembl known predicted genes (*N-cadherin*, *S100a11* and *2010203J19Rik*), as well as two novel predicted genes (fig. 1). From all these, the *N-cadherin* gene (6 cM) might be considered as a good candidate gene since cell-to-cell adhesion is dramatically changed during the development of malignant cancer. This gene is a member of a family of single-pass transmembrane proteins that mediate Ca^{2+} -dependent adhesion between the cells of solid tissues which includes *P*, *E*, *R*, and *VE-cadherin* (classical cadherins, type I)¹¹. In regard to oncogenesis, the reduced expression of *E-cadherin* has been described as an essential event in advanced carcinomas¹²⁻¹⁴. However, unexpectedly, a significant enhancement of *N-cadherin* protein has been found in invasive undifferentiated breast carcinoma cells^{15,16}. Thus, further mutational and functional studies of *N-cadherin* should be done in order to confirm a possible role for this gene in the development of γ -radiation-induced thymic lymphomas.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología from Spain (n° PM99-0003) and Comunidad de Madrid (n° 08.1/0013.1/2000) to J.F-P, and the Comunidad de Madrid (n° 08.1/0020.2/2000) to J.S. We thank Dr. Olfert Landt (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Germany) for him technical help with the design of FRET probes.

References

1. Santos J, Pérez de Castro I, Herranz M, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. Allelic losses on chromosome 4 suggest the existence of a candidate tumor suppressor gene region of about 0.6 cM in γ -radiation-induced mouse primary thymic lymphomas. *Oncogene* 1996;12:669-76.
2. Santos J, Herranz M, Pérez de Castro I, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. A new candidate site for a tumor suppressor gene involved in mouse thymic lymphomagenesis is located on the distal part of chromosome 4. *Oncogene* 1998;17:925-9.
3. Meléndez B, Santos J, Fernández-Piqueras J. Loss of heterozygosity at the proximal-mid part of mouse chromosome 4 defines two novel tumor suppressor gene loci in T-cell lymphomas. *Oncogene* 1999;18:4166-9.
4. Santos J, Herranz M, Fernández M, Vaquero C, López P, Fernández-Piqueras J. Evidence of a possible epigenetic inactivation mechanism operating on a region of mouse chromosome 19 in γ -radiation-induced thymic lymphomas. *Oncogene* 2001;20:2186-9.
5. Malumbres M, Perez de Castro I, Santos J, Fernández-Piqueras J, Pelliver A. Hypermethylation of the cell-cycle inhibitor p15INK4b 3'-untranslated region interferes with its transcriptional regulation in primary lymphomas. *Oncogene* 1999;18:385-96.
6. Herranz M, Santos J, Salido E, Fernández-Piqueras J, Serrano M. Mouse p73 gene maps to the distal part of chromosome 4 and might be involved in the progression of γ -radiation-induced T-cell lymphomas. *Cancer Res* 1999;59:2068-71.
7. Matsumoto Y, Kosugi S, Shinbo T, et al. Allelic loss analysis of gamma-ray-induced mouse thymic lymphomas: two candidate tumor suppressor gene loci on chromosomes 12 and 16. *Oncogene* 1998;16:2747-54.
8. Okumoto M, Song CW, Tabata K, et al. Putative tumor suppressor gene region within 0.85 cM on chromosome 12 in radiation-induced murine lymphomas. *Mol Carcinog* 1998;22:175-81.
9. Okumoto M, Park Y-G, Song C-W, Mori N. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 4, 12 and 19 in radiation-induced lymphomas in mice. *Cancer Lett* 1999;135:223-8.
10. Okano H, Saito Y, Miyazawa T, et al. Homozygous deletions and point mutations of the *Ikaros* gene in γ -ray-induced mouse thymic lymphomas. *Oncogene* 1999;18:6677-83.
11. Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. *Byochemistry* 2001;66:1174-86.
12. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999;24:73-6.
13. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392:190-3.
14. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991;51:6328-37.
15. Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 1997;4:399-411.
16. Hazan RB, Philips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000;148:779-90.

Epigenetic silencing of E- and N-cadherins in the stroma of mouse thymic lymphomas

M.Matabuena de Yzaguirre, J.Santos Hernández,
P.Fernández Navarro, P.López Nieva, M.Herranz¹,
M.F.Fraga¹, M.Esteller^{1,*}, A.Juarranz² and
J.Fernández-Piqueras

Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Biología,
Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Madrid, España, ¹Cancer
Epigenetics Laboratory, Molecular Pathology Programme, Spanish National
Cancer Centre (CNIO), Madrid, Spain and ²Unidad de Biología Celular,
Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid,
28049-Madrid, España

*To whom correspondence should be addressed: Tel: 34 91 2246940;
Fax: 34 91 2246023;
Email: mesteller@cnio.es

Aberrant expression of some tumour suppressor genes and oncogenes by thymocytes had been involved in the development of primary thymic lymphomas induced by γ -irradiation, but genetic alterations affecting critical genes expressed by stromal cells have not been yet explored. This paper analyzes a series of such tumours induced in C57BL/6J and in F1 hybrids of BALB/c and C57BL/6J mouse strains. As expected, histopathological analyses revealed profound disorganizations within the thymus with a poor demarcation of the cortical and medullar areas. Immunological and quantitative on-line RT-PCR analyses confirm that *E-cadherin* (*Cdh1*) is essentially expressed by stromal cells of the thymus, while evidencing that the expression of this gene is significantly reduced in all tumours. In addition, and contrary to what one would expect, *N-cadherin* (*Cdh2*) that is exclusively expressed by stromal cells is likewise down-regulated in most of the thymic lymphomas. Although hypermethylation of the promoter region appears to be involved in the inactivation of *Cdh2* in all tumours, additional epigenetic mechanisms mediated by repressors such as *Snail* may also play a role in *Cdh1* silencing. These results represent the first reported case for tumour-associated gene alterations occurring not in the tumour cells per se, but in the stromal cells of primary thymic lymphomas. Additionally, since the expression of both genes is significantly up-regulated after a single high dose of γ -radiation, but remained unchanged in treated thymic-lymphoma-free-mice, epigenetic down-regulation of *E-* and *N-cadherin* appears to occur concomitantly with the progression towards the most advanced stages of γ -radiation-induced thymic lymphomas.

Introduction

Gamma-radiation-induced thymic lymphomas consist of a heterogeneous group of T-cell lymphoblastic lymphomas characterized by an uncontrolled expansion of immature T-cell precursors that fail to complete differentiation.

A number of papers have shown that alterations of several oncogenes and tumour suppressor genes expressed by thymocytes help explain the development of this kind of lymphomas (1–12). Still the thymus is a heterogeneous lobed organ having also stromal cells that provide a variety of microenvironments where thymocytes proliferate and mature (13). As of this writing there are no reports recording genetic alterations of critical genes expressed by stromal cells during the origin and/or progression of thymic lymphomas.

In order to characterize the pattern of expression of some of these genes, our research focused on *E-* and *N-cadherin* that are expressed by stromal epithelial and mesenchymal cells, respectively. Classical cadherins encode for a group of membrane receptors that mediate calcium-dependent homotypic (and sometimes heterotypic) cell-to-cell adhesion. These proteins might be involved in the maintenance of haematopoietic stem cells, acting as a negative regulator of WNT-pathway signalling by binding thereby and sequestering β -catenin from the nucleus. Alternatively, the accumulation of β -catenin in the cytoplasm may facilitate its displacement to the nucleus, where it would bind to the transcriptional factor *Tcf* thereby stimulating transcription of target genes involved in cell proliferation and differentiation (13–15).

In mice, both stromal epithelial cells as well as fetal thymocytes and a fraction of the neonatal and adult T-cells clearly express *E-cadherin* (16,17). Interestingly, the progression of double-negative (CD4–CD8–) to double-positive (CD4+CD8+) thymocytes may be disturbed after inhibition of the homotypic *E-cadherin* interactions (18). Furthermore, interactions of thymic epithelial cells (expressing *E-cadherin*) with CD103+ thymocytes [expressing α_E (CD103) β_7 integrin] can lead to enhanced thymocyte proliferation in human (19). Several other classical cadherins (Cadherin-6, 8 and 11) have also been found by RT-PCR on murine thymocytes, though these studies have not been confirmed on immunological ground (17). In human bone marrow *N-cadherin* is expressed by early haematopoietic progenitor cells (CD34+CD19+) but is down-regulated by more mature progenitor cells (20).

In oncogenesis, both a loss of the epithelial *E-cadherin* (*Cdh1*) and a gain of the mesenchymal cadherins such as *N-cadherin* (*Cdh2*) have been reported during the progression of many solid tumours (14). Still, the role of cadherins in primary haematological malignancies is only starting to be recognized (21–24). For this reason, it is reasonable to think that the study of these members of the cadherin family in the thymus may help us reach a more precise knowledge of the molecular alterations underlying the progression of thymic lymphomas.

In this study, we report that in the thymus of mice *E-cadherin* is essentially expressed by stromal cells and to a lesser extent by thymocytes, whereas *N-cadherin* is only expressed by stromal cells. In addition, the analysis of a sample series of γ -radiation-induced murine-thymic-lymphomas revealed significant reductions of both *E-* and *N-cadherin* in all tumours examined suggesting the existence of epigenetic

control events. For such reasons, we propose that the down-regulation of stromal *E*- and *N*-cadherin in these cells may be contributing to the development of primary thymic lymphomas.

Materials and methods

Mice and tumour induction

Reciprocal inter-strain crosses, involving males and females from the BALB/cJ and C57BL/6J strains, were carried out in order to generate F1 hybrid mice. Five adult mice were treated with a single high dose of γ -radiation (10 Gy) and killed 24 h later. A series of 14 thymic lymphomas were obtained by whole body γ -radiation of 17 adult mice split into four weekly doses of 1.75 Gy as described in a previous work (25). Five additional thymic lymphomas were induced in C57BL/6J mice. All of the tumour samples were frank T-cell lymphomas in their most advanced stage of development.

Sample cell fractionation

Samples from three thymic lymphomas, two thymuses of mice treated with a single high dose and three control-healthy thymuses from C57BL/6J mice were washed and strained through a nylon mesh (BD Falcon Cell Strainer, BD Biosciences, Belgium). Stroma-enriched cell fractions were obtained by collagenase digestion according to a previously described method (26). This procedure allows for the discrimination of a significant amount of stromal cells (including epithelium, endothelium, reticular fibroblasts, macrophages, dendritic cells and neuroendocrine cells) from other cells (CD45⁺) derived from the haematopoietic stem cells. Thymocyte isolation was carried out by centrifugation on Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden) as described previously (27). Thymocytes were afterwards positively selected by magnetic sorting using the Pan T-cell Isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, BG, Germany). The purity of the isolated thymocytes was confirmed through flow cytometry (Cytomics FC 500 Series Flow Cytometry Systems, Beckman Coulter, Fullerton, CA) using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD3 (Becton Dickinson, Pharmingen, Franklin Lakes, NJ), SPRD-conjugated anti-CD45 (Southern Biotech, Birmingham, Alabama), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD4 (Becton Dickinson, Pharmingen) and FITC-conjugated anti-CD8 (Becton Dickinson, Pharmingen).

Histopathology and immunofluorescence staining

For histopathology two control thymuses from C57BL/6J and two γ -radiation-induced thymic lymphomas were fixed with 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4°C, and embedded in paraffin. Tissue sections were prepared, stained with hematoxylin and eosin and examined under the microscope. Immunofluorescence staining was also performed on fine tissue sections (2 μ m) of control thymuses and thymic lymphomas using mAb to E-cadherin (1:50, Becton Dickinson, Pharmingen). The secondary antibody used was Alexa 448 (Molecular probes, Eugene, OR). The sections were mounted on Vectashield (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) and the preparations were visualized with an Olympus photomicroscope IMT-2, equipped with a HBO 100 W mercury lamp. The corresponding filter sets for fluorescence microscopy used were ultraviolet (UV, 365 nm, exciting filter UG-1) for 4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Roche) and blue (450–490 nm. Exciting filter BP 490) for Alexa.

Quantitative real-time RT-PCR

For the determination of gene expression levels of *N*- and *E*-cadherin, as well as those of *Snail*, a quantification assay on the basis of real-time reverse transcription PCR with a LightCycler instrument (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) was established, by means of a fluorescence-resonance energy transfer (FRET) technique. This method involves two oligonucleotide probes that bind to the target DNA. In our case the 3' probe had a donor fluorophore (fluorescein) at the 5' end whereas the 5' probe had an acceptor fluorophore (LightCycler-Red 640 or LightCycler-Red 705) at the 3' end. RT-PCR of the gene encoding the tubulin beta 5 chain (*Tubb5*) (<http://www.informatics.jax.org>) was used as an internal control of the RNA quality and its amplification. Primers for mRNA amplifications and for the FRET probes were as follows: for *Cdh1*, 5'-AAGTGACCGATGATGATGCC-3' (forward), 5'-CTTCATTCACGTCTACCACGT-3' (reverse), 5'-GTCACAGACCCAC-GACCAATGAT-3' (fluorescein) and 5'-GCATTTTGAAAACGCAAGG-GC-3' (LCRed640); for *Cdh2*, 5'-GTGGAGGCTTCTGGTGAAT-3' (forward), 5'-CTGCTGGCTCGCTGCTT-3' (reverse), 5'-ATTGCAGTGTCT-GAATTCACATTGAGA-3' (fluorescein), and 5'-GGCTGCTCTTCG-TGCACATCCTTC-3' (LCRed640); for *Snail*, 5'-CTCTGAAGATGCACA-TCCGAA-3' (forward), 5'-ACTGGTATCTCTTCACATCCGAGT-3' (reverse), 5'-CGTCCGACCCACACATG-3' (fluorescein), 5'-GAGAAGC-CATTCTCTGCTCCAC-3' (LCRed640); and for *Tubb5*, 5'-TGGGAC-

TATGGACTCCGTTTC-3' (forward), 5'-AAAGCCTTGACGGCAATCA-3' (reverse), 5'-GGCCTTTAGCCAGTTGCTTGCCT-3' (fluorescein) and 5'-CCCCAGACTGACCGAAAACGAAGTT-3' (LCRed705). The hybridization probes were designed by TibMolBiol, Berlin (Germany). RT-PCRs were performed in either total thymus samples or cell fractions by means of the one-step LightCycler (Roche) kit. Two-hundred nanograms of total cellular RNA, extracted by the TriPure Isolation Reagent method (Roche), were used to generate cDNA in a reaction containing 3.25 mM of Mn (OAc)₂, 0.5 μ M of each primer, 0.2 μ M of each probe and 1 \times LC RNA Master Hybridization Probes mix (Roche). The cDNA of *Tubb5* was subsequently co-amplified with the cDNA of either *Cdh1* or *Cdh2* or *Snail* under the following PCR conditions: 95°C for 2 min followed by 40 cycles with 95°C for 10 s, 55°C for 30 s and 72°C for 15 s (it was at this stage that the on-line measurements took place). The expression level in each sample was estimated with the calibrator normalized relative quantification method of the Light-Cycler Relative Quantification software (Roche). Statistical significances were determined using a one-way ANOVA with a Tukey comparison post-test. All statistical tests were carried out using SPSS software (SPSS Inc., version 12.0, Chicago, IL).

Immunoblotting

For the analysis of the cadherin total control thymuses or thymic lymphomas were lysed in the TriPure Isolation Reagent (Roche) or the RIPA Cell Lysis buffer: 100 mM NaCl, 50 mM, pH 7.4, Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% Deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate and Triton X-100, containing 10 mM CaCl₂ with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma, St Louis, MI), and recommended amounts of Protease Inhibitor Cocktail and Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Roche). Electrophoresis was performed with 25–30 μ g of protein per sample on 8% SDS-PAGE. The separated gels were transferred to pure nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) for 1 h 30 min at 4°C. The membrane was incubated in a blocking buffer containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20 and 5% dry milk for 1 h at room temperature. Membranes were incubated with anti-N-cadherin (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) and anti-E-cadherin (kindly provided by Dr A. Cano) monoclonal antibodies overnight at 4°C, then washed and incubated with appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase. Subsequently, the membrane was washed and incubated in Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate (Roche) and exposed to X-ray film. Positive control for E- and N-cadherin was obtained from HaCaT cells and brain samples, respectively. In addition, anti- β -actin antibody (Sigma, St Louis, MO) was used as a loading control.

Methylation-specific PCR (MSP) and DNA sequencing

MSP was carried out following the method developed by Herman *et al.* (28). Genomic DNA isolated by standard procedures was modified by treatment with sodium bisulfite, then purified using the Wizard DNA Clean-up system (Promega, Madison, WI). CpG islands were identified using the CpGPlot program (EMBOSS: <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/cpgplot.html>) and the published promoter sequences of *Cdh1* (NCBI accession number X60961) and *Cdh2* (Ensembl Mouse Genome ENSMUSG00000024304). In order to determine the methylation status of both genes the following primers have been designed: *Cdh1* unmethylated primers, 5'-TTATTGGTGTGGGAGTT-GTGGT-3' (sense) and 5'-CACCAAATCCCATAACAAACCCA-3' (antisense) to amplify a 130 bp fragment; *Cdh1* methylated primers, 5'-ATTGGTGTGGGAGTCGCGG-3' (sense) and 5'-AACTCCCATAAC-GAACCCGACA-3' (antisense) to amplify a 135 bp fragment; *Cdh2* unmethylated primers, 5'-TTTGTGAGAGTGTTATTGTTTAGT-3' (sense) and 5'-ACACATATACATATACAAACCAC-3' (antisense) to amplify a 120 bp fragment; *Cdh2* methylated primers, 5'-CGTGAGAGCGTTATT-CGTTTAGC-3' (sense) and 5'-GCGTATACGTATATACGAACCGC-3' (antisense) to amplify a 121 bp fragment. PCR amplifications were performed in a PTC-100 Programmable Thermal Controller thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA), using FastStart Taq DNA Polymerase (Roche). The cycling parameters were 95°C for 12 min followed by 35 cycles with 95°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s, and finally 72°C for 7 min. DNA isolated from normal thymuses treated *in vitro* with SssI methyl transferase and non-treated were used as positive (methylated) and negative (non-methylated) controls, respectively. The PCR products were loaded on a 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide. All of the assays were repeated three times, and methylated CpG sites were confirmed by DNA sequencing using the following primers: *Cdh1* bisulfite sequencing primers, 5'-GTTAGAGTA-TAGTTAGGTTAGGA-3' (sense) and 5'-CTACTACACCTAACTCCCA-3' (antisense) which amplify a 372 bp fragment; *Cdh2* bisulfite sequencing primers, 5'-AGGGAAGGGAAAAGYGGGGGTT-3' (sense) and 5'-ACCCCTTCTCCCTACTACTA-3' (antisense) which amplify a 381 bp fragment.

Results

Histopathological analysis

As reported by other studies, control thymuses from C57BL/6J mice exhibit a clear distinction between the cortex and the medulla (Figure 1A–C). In thymus lymphoma the gland is considerably larger and the histopathological sections show a profound disorganization with a poor demarcation of the cortical and medullar areas featuring large lymphoblastic T-cells, frequent mitoses and pycnotic cells (Figure 1D and E). Finally, stromal cells that are visible in the medulla of control thymuses (Figure 1C) appear randomly distributed in thymic lymphomas (Figure 1E).

Expression analyses of *E-cadherin* and *N-cadherin*

The expression of *E-cadherin* in the thymus was initially determined by immunofluorescence staining (Figure 2). In control thymuses (Figure 2A and E) strong surface labelling was found essentially in the medullar-stromal cells and to a lesser extent in some of the cortical epithelial cells (Figure 2E). In thymic lymphoma immunoreactivity appears to be restricted to aggregations of stroma-tumoral cells randomly dispersed (Figure 2B and F).

Since immunofluorescence staining is not sensitive enough to exclude the possibility that thymocytes could also express *E-cadherin*, we determined which cell types really expressed this gene through quantitative fluorescent-real-time RT-PCR, using total RNA from whole-control thymuses and separated cell fractions. Taking the level of expression of *E-cadherin* in control thymuses as a reference unit, similar amounts (200 ng) of total RNA from the stromal cells exhibited the highest levels

of mRNA expression (mean normalized value 4.46 and SD 0.12), whereas purified thymocytes evidenced significant but substantially lower levels of mRNA from this gene (mean normalized value 0.19 and SD 0.022). Using a similar approach, we demonstrated that *N-cadherin* is also expressed by the stromal cells of control thymuses (mean normalized value 3.88 and SD 0.56). In isolated thymocytes mRNA of *N-cadherin* was practically undetectable (mean normalized value 0.03 and SD 0.03).

Since loss of epithelial *E-cadherin* expression and gain of mesenchymal *N-cadherin* have been observed during the development of many solid cancers, we further investigated whether such changes could also be operating in primary thymic lymphomas induced with γ -irradiation. To this end, we performed quantitative fluorescent-real-time RT-PCR experiments using total RNA extracted from the thymuses of five mice 24 h after treatment with a single high dose of radiation, as well as from 14 thymic-lymphoma-bearing mice treated weekly with four low doses of radiation, and thymuses of three treated mice that did not develop thymic lymphoma. A significant increase in the expression of both *E-* and *N-cadherin* for thymuses of mice treated with single high doses when compared with control thymuses was found (*E-cadherin*: mean normalized value 35.17 SD 0.216; *N-cadherin*: mean normalized value 32.47 and SD 0.38). In the case of *E-cadherin* this increase can be attributed to both stromal cells and thymocytes (Stroma: mean normalized value 64.56, SD 0.14; Thymocytes mean normalized value 6.51, SD 0.47). However, the expression of these genes remained unaltered in tumour-free mice (*E-cadherin* mean normalized value 0.96, SD 0.09; *N-cadherin* mean normalized value 0.95,

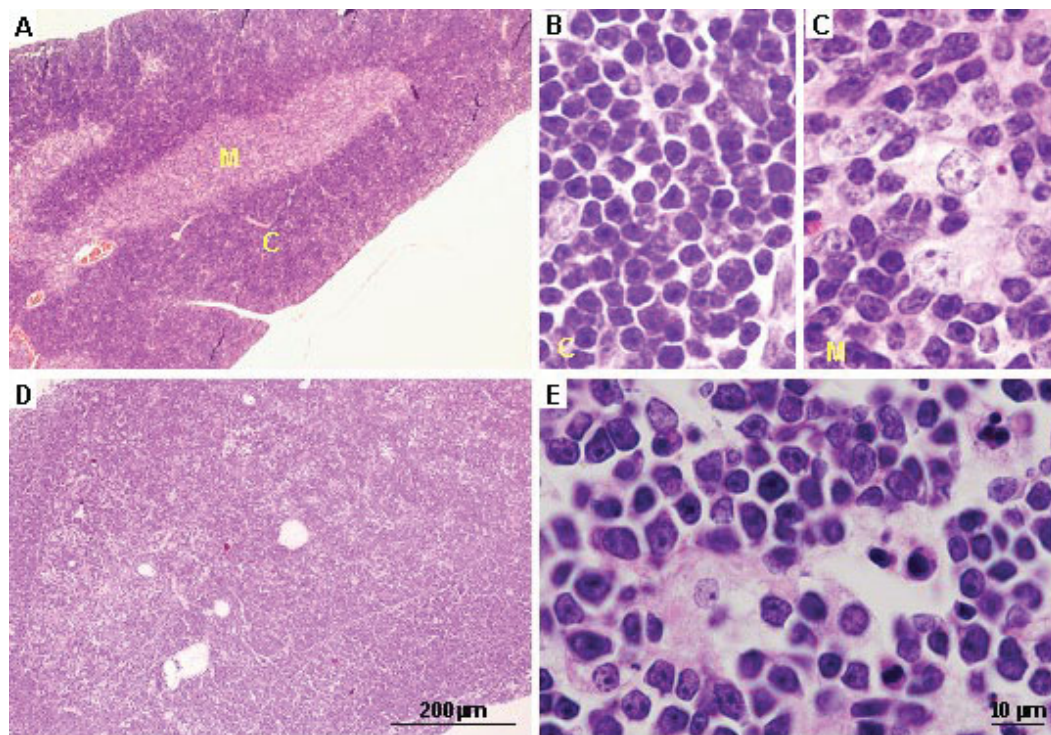


Fig. 1. Tissue sections from a control thymus (A–C) and a thymic lymphoma (D–E) stained with hematoxylin and eosin. Sections of control thymus show clearly defined cortical (C) and medullar (M) regions, with the thymocytes mainly located within the cortex in the spaces created by the epithelial cells. In thymic lymphoma no apparent differences can be detected between the cortex and the medulla, and thymocytes are randomly distributed. Scale bar: 200 μ m (A and D) and 10 μ m (B, C and E).

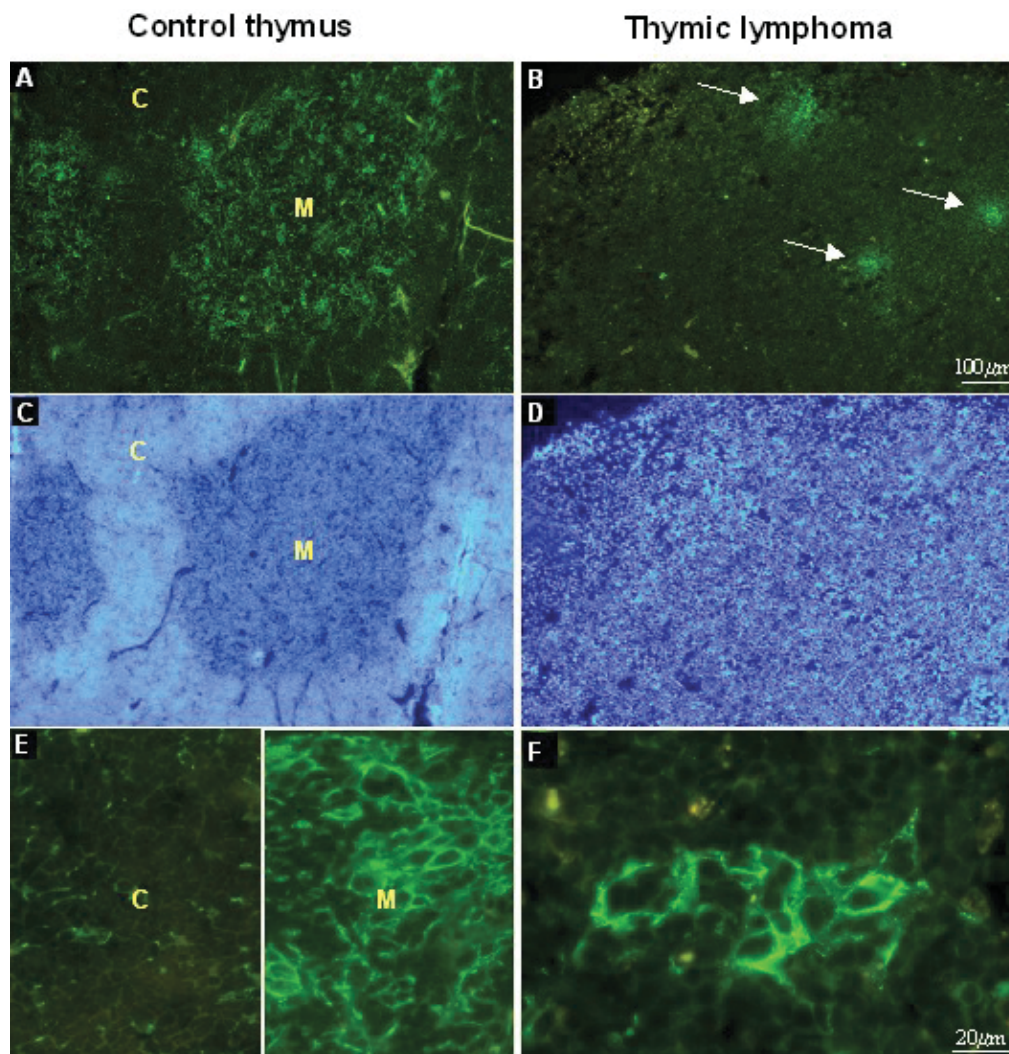


Fig. 2. Immunofluorescence staining of E-cadherin in sections of a control thymus (A and E) and a thymic lymphoma (B and F). C and D represent DAPI counterstaining of A and B, respectively. In control thymus immunostaining is mainly visible in the cell membrane of stromal cells (E and F) at the medullar region (M), though a number of cells in the cortex (C) also react positively to the antibody. Thymic lymphomas exhibit randomly dispersed aggregations of tumoral positive cells (arrows). Scale bar: 100 µm (A–D) and 20 µm (E and F).

SD 0.08). In relation to thymic lymphomas all these tumours exhibited a considerable reduction in the levels of *E-cadherin* expression in comparison with control thymuses (mean normalized value 0.16 and SD 0.20), this reduction being produced by down-regulation of this gene in the stromal portion of lymphomas (Stroma: mean normalized value 1.62, SD 0.18). On the other hand, the levels of expression of *N-cadherin* (*Cdh2*) were likewise considerably reduced in 13 of the 14 tumours (i.e. 92.85%) (mean normalized value 0.47; SD 0.32). Table I shows specific data about mRNA expression of *E-* and *N-cadherin* in each tumour. *E-cadherin* values varied between 0.025 and 0.695 (SD from 0.007 to 0.148) in relation to control thymuses. The levels of *N-cadherin* expression ranged from 0.145 to 0.73 (SD from 0.007 to 0.078) in relation to the mean value from control thymuses. All RT–PCR data represent an average from two independent amplifications for each sample. A one-way ANOVA and a Tukey comparison post-test evidence that differences between control thymuses and thymic lymphomas were clearly significant ($P < 0.001$).

In order to determine whether the mRNA profiles of thymic lymphomas correlated well with protein expression western

blot analyses on the same panel of tumours were performed. Using the expected molecular weights as well as the positive controls from HaCaT cells and brain samples as a reference, we deduced that all of the tumours have failed to express significant amounts of proteins from both of these genes. Whereas 2 out of 14 tumours (14.28%) exhibited traces of E-cadherin, this protein was completely absent in 12 out of the 14 tumours (85.72%) (Table I and Figure 3A). Similar results were obtained for N-cadherin protein expression (Table I and Figure 3B). The expression of *E-cadherin* was also studied using protein samples from stromal cells and isolated thymocytes. Consistent with the transcriptional data, the amount of protein detected in stromal cells of three of the tumours was found to lie between those observed in whole control thymuses and those of thymic lymphomas (data not shown).

Hypermethylation in tumour samples

Previous works have demonstrated that *E-cadherin* is frequently silenced by promoter hypermethylation in many other cancer types (29). For such reasons we were interested

Table I. Gene expression and methylation data of thymic lymphomas

Sample	RT-PCR (LightCycler)			WB		MSP	
	Cdh1 Normalized mean ratio \pm SD	Cdh2 Normalized mean ratio \pm SD	Snai1 Normalized mean ratio \pm SD	Cdh1	Cdh2	Cdh1	Cdh2
(C57BL/6Jx BALB/cJ) F1	1	1	1	+	+	U	U
BLB 4	0.06 \pm 0.0141	0.145 \pm 0.0071	0.525 \pm 0.0212	—	—	U	M
BLB 6	0.045 \pm 0.0071	0.705 \pm 0.0354	0.48 \pm 0.0141	—	—*	M	M
BLB 18	0.095 \pm 0.0212	0.475 \pm 0.0212	0.68 \pm 0.0283	—	—	U	U
BLB 31	0.695 \pm 0.1485	0.73 \pm 0.0424	1.875 \pm 0.0778	—	—	U	M
BLB 36	0.045 \pm 0.0071	0.29 \pm 0.0141	0.54 \pm 0.0283	—	—	M	M
BLB 44	0.05 \pm 0.0141	0.3 \pm 0.0141	0.78 \pm 0.0283	—	—	U	M
BLB 50	0.55 \pm 0.1131	0.72 \pm 0.0424	1.01 \pm 0.0424	—	—	U	M
BLB 60	0.025 \pm 0.0071	0.22 \pm 0.0141	0.61 \pm 0.0283	—	—	M	M
BLB 66	0.14 \pm 0.0283	0.385 \pm 0.0212	0.565 \pm 0.0212	—*	—*	U	M
BLB 67	0.165 \pm 0.0354	0.475 \pm 0.0212	0.545 \pm 0.0212	—	—	U	M
BLB 74	0.21 \pm 0.0424	0.26 \pm 0.0141	1.76 \pm 0.0707	—*	—	U	M
BLB 85	0.07 \pm 0.0141	1.385 \pm 0.0778	1.76 \pm 0.0707	—	—	U	U
BLB 88	0.095 \pm 0.0212	0.395 \pm 0.0212	1.175 \pm 0.0495	—	—	M	M
BLB 95	0.06 \pm 0.0141	0.19 \pm 0.0141	0.975 \pm 0.0354	—	—	U	M

A summary of the results derived from transcriptional expression (RT-PCR), translational expression (WB) and the methylation status of promoter regions (MSP) of cadherin genes, as well as RT-PCR analysis of *Snai1*. The WB values for both genes were designed as + (similar level of expression than in the controls), (—) (reduced expression). An asterisk over a (—) sign denotes traces of expression. M, methylated; U, unmethylated.

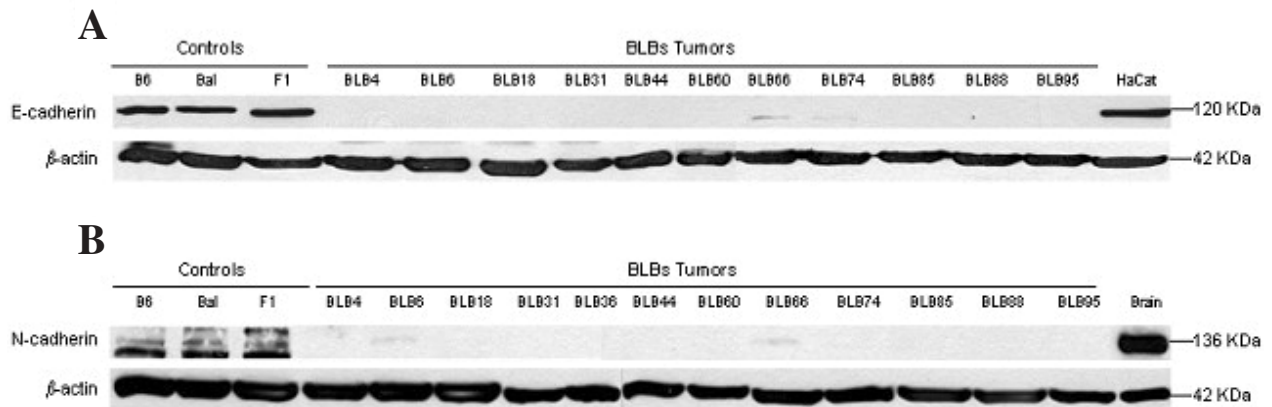


Fig. 3. Western blot analysis of *E-cadherin* (A) and *N-cadherin* (B). B6 and Bal identified the C57BL/6J and BALB7cJ strains, respectively. F1, control-hybrid mice. BLB4-95, thymic lymphomas induced in F1 hybrids. HaCaT and Brain, positive-control samples. Tumours BLB18 and 66 exhibit traces of E-cadherin protein and tumours BLB66 and 74 exhibit traces of N-cadherin protein.

in determining whether or not the down-regulation of *E-* and *N-cadherin* could be attributed to epigenetic mechanisms. To this end, MSP/sequencing analyses were conducted on genomic DNA from these tumours in order to screen for aberrant methylation at their promoter regions.

The methylation status of the *Cdh1* promoter was determined by evaluating the methylation density of 27 CpG sites spanning the -223 and $+157$ bp region of the *Cdh1* sequence (Figure 4 and Table I). *Cdh1* promoter hypermethylation on this critical region was recorded in 4 out of 14 (i.e. 28.57%) of the analyzed tumours (Figure 4A). DNA sequencing of bisulphite-treated DNA using external primers allowed us to further corroborate these results (Figure 4B). Although *Cdh1* promoter hypermethylation was always associated with a clear reduction in the levels of gene expression (Table I), it did not reach statistical significance (Student's *t*-test $P > 0.01$), suggesting the existence of additional mechanisms for *Cdh1* inactivation in these tumours.

N-cadherin promoter hypermethylation was detected in 12 out of 14 (i.e. 85.71%) of the analyzed tumours (Figure 5A and Table I). As in the previous case, a sequencing analysis using external primers corroborated these results, with 19 methylated CpG dinucleotides around the transcription start site (Figure 5B). All of the 12 methylated tumours exhibited reduced levels of mRNA transcription while one of the two un-methylated tumours expressed detectable levels of expression (in fact, similar to or even higher than those of the control samples) (Table I). Interestingly, we found a significant decrease in the level of expression of this gene between methylated and unmethylated tumours (Student's *t*-test, $P < 0.05$).

In order to determine whether the observed methylation changes are the consequence of tumorigenesis or just radiation/aged, we analysed the methylation status of *Cdh1* and *Cdh2* in tumour-free mice after aging or radiation treatments (single high doses and four lower doses). Interestingly, we

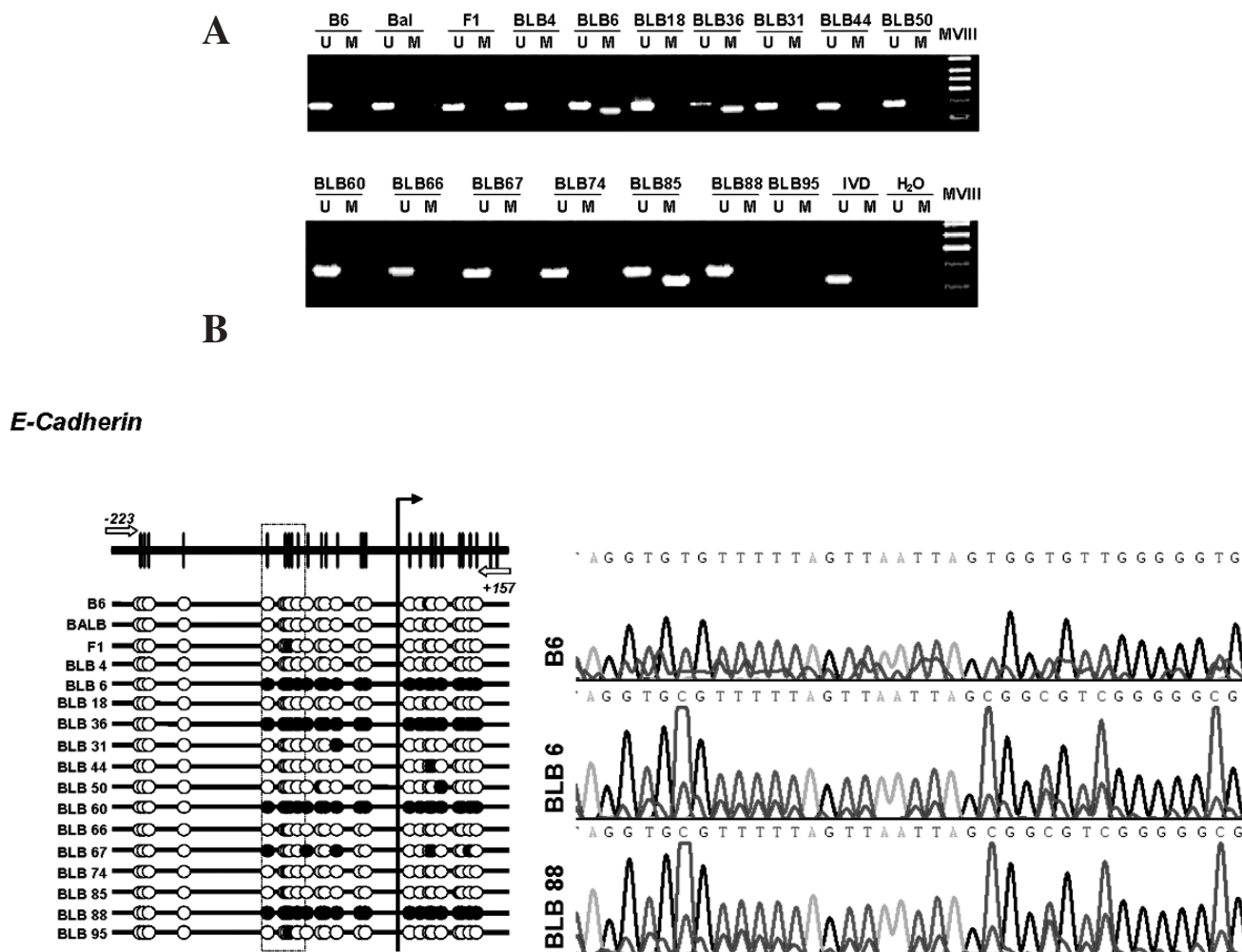


Fig. 4. Methylation specific analysis at the promoter region of the *E-cadherin* gene. B6 and Bal identified the C57BL/6J and BALB7cJ strains, respectively. F1, control-hybrid mice. BLB4-95, thymic lymphomas induced in F1 hybrids. (A) MSP of a representative CpG island at the promoter region. U, unmethylated; M, methylated; IVD, *in vitro* methylated DNA from control thymus. (B) Determination of cytosine methylation at specific CpG sites by DNA sequencing of bisulfite-treated genomic DNA from control and tumours. Open and filled circles denote non-methylated and methylated CpG sites, respectively.

have not detected significant changes in the status of promoter methylation in any case with respect to the control samples (data not shown).

Transcriptional expression of Snail

As 10 out of the 14 thymic lymphomas exhibited reduced mRNA *E-cadherin* expression but did not display promoter hypermethylation, we finally tested whether these tumours exhibited an increased expression of *Snail*, a gene capable of inhibiting *E-cadherin* (39). Interestingly, three of these tumours showed an over-expression of *Snail* (Table I), suggesting that this gene could be responsible (at least in part) for the down-regulation of *E-cadherin* in some of the thymic lymphomas.

Discussion

Classical cadherins have been involved in the maintenance of haematopoietic stem cells, as well as in thymocyte differentiation (18) and proliferation (19). In regard to oncogenesis, the majority of the studies have focussed on the diminished expression of *E-cadherin* from different carcinomas (29).

With the exception of pancreatic-ductal-epithelial cell lines (30), the reduced level of *E-cadherin* mRNA observed in several human cancers (including melanoma, prostate and breast cancers) is often accompanied by the *de novo* expression of *N-cadherin* (31,32). In fact, *N-cadherin* is up-regulated in the more invasive and less differentiated of the breast cancer cell lines that lack *E-cadherin* expression (33,34). These observations led to postulate for a 'cadherin switch' between *E-* and *N-cadherin* during the progression of cancer, suggesting that the loss of epithelial *E-cadherin* is followed by an up-regulation of the mesenchymal *N-cadherin* that enhances the motility and invasive capacities of the tumorous cells. Recent insights into haematological malignancies have revealed a significant reduction or an absence of *E-cadherin* expression in human acute myelogenous leukaemia and in chronic lymphocytic leukaemia (21) as well as in Hodgkin and Red-Steinberg cells (22). In humans, *N-cadherin* has also been detected in T-cell leukaemia and lymphoma cells but not on normal leukocytes (23,24). To this day, however, no one has reported anything on the role played by these cadherins in primary thymic lymphomas.

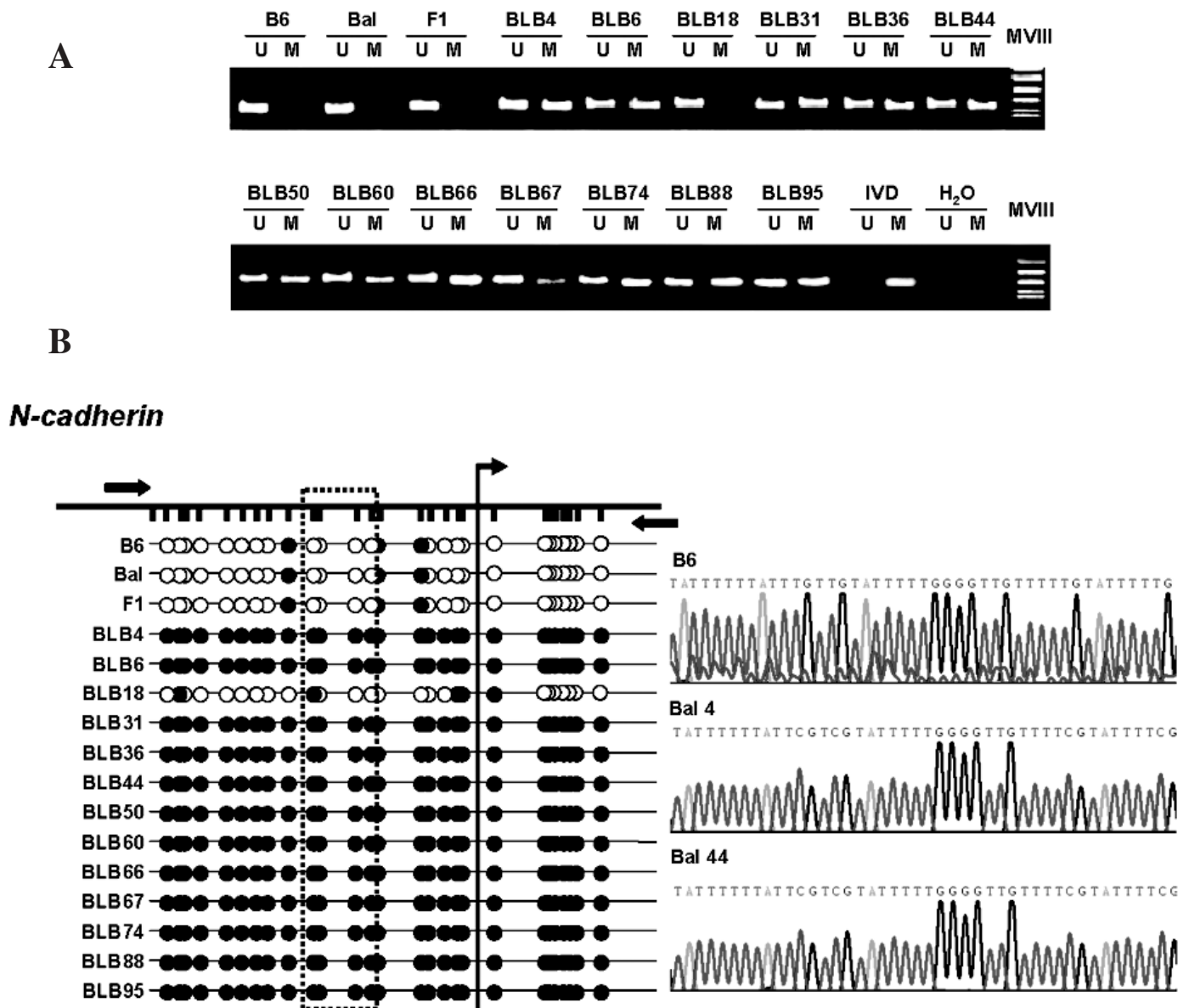


Fig. 5. Methylation specific analysis at the promoter region of the *N-cadherin* gene. B6 and Bal identify the C57BL/6J and BALB7cJ strains, respectively. F1, control-hybrid mice. BLB4-95, thymic lymphomas induced in F1 hybrids. (A) MSP of a representative CpG island at the promoter region. U, unmethylated; M, methylated. (B) Determination of cytosine methylation at specific CpG sites by DNA sequencing of bisulfite-treated genomic DNA from control and tumours. Open and filled circles denote non-methylated and methylated CpG sites, respectively.

Using immunofluorescence and quantitative fluorescence-real-time RT-PCR experimental approaches, we confirmed that stromal cells of control thymuses express significant amounts of *E-cadherin* mRNA and demonstrated for the first time that the stromal cells likewise express *N-cadherin* mRNA even though at more reduced levels. Isolated thymocytes also expressed small amounts of *E-cadherin* mRNA yet failing to produce detectable levels of mRNA from the *N-cadherin* gene.

As expected, the analysis on a sample series of advanced murine thymic lymphomas induced by γ -rays evidenced a significant reduction of both the *E-* and *N-cadherin* expression in almost all of the tumours, suggesting that inhibition of both genes may be critical in the progression towards the most advanced stages of lymphomagenesis. These hypotheses might be supported by the fact that in thymuses from

treated-lymphoma-free mice the levels of *E-cadherin* did not differ significantly when compared with those detected in control non-treated thymuses. However, it should be stressed that thymuses from mice exposed to single high doses of radiation and killed 24 h later experienced a considerable over-expression of both genes. This early response to radiation could be indicating that, contrary to the situation recorded in the most advanced stages, high levels of *E-* and *N-cadherin* may be favouring the initial stages of tumorigenesis. This is probably accomplished by enhancing thymocyte cell proliferation through adhesive interactions between thymic epithelial cells and thymocytes mediated by the E-cadherin-CD103 integrin-ligand-pair (19).

With regard to thymic lymphomas down-regulation of both genes appears to occur concomitantly with the progression towards the most advanced stages of lymphomagenesis.

In contrast to peripheral lymphomas, these results suggest that in primary thymic lymphomas *N-cadherin* is not counteracting the effects produced by *E-cadherin*. Whereas the up-regulation of *N-cadherin* might prove useful to promote invasivity and metastasis in peripheral lymphomas, a completely different scenario seems to be operative in thymic lymphomas where *E-* and *N-cadherin* apparently work in the same direction. Reduced levels of *N-cadherin* expression are in agreement with the loss of heterozygosity we have already detected in other sample series of this kind of tumours involving the chromosomal region where this gene is located (34). Since both *E-* and *N-cadherin* are essentially expressed by stromal cells, the detection of significant differences between their levels of expression in stromal cells of control thymuses versus thymic lymphomas leads us to postulate that the decline in the levels of expression of both genes in whole lymphomas could be tentatively attributed to their down-regulation in stromal cells.

To gain further understanding of the mechanisms involved in the down-regulation of cadherins, the levels of methylation of their promoter CpG islands by means of a MSP/sequencing analysis were studied. The importance of gene silencing in γ -radiation-induced thymic-lymphomas by promoter hypermethylation is highlighted in previous reports that call upon epigenetic events in the inactivation of other genes (*p15/Ink4b* and *p16/Ink4a*) (2,3,5). Hypermethylation of the *E-cadherin* promoter region has been reported in several kinds of human tumours including breast, gastric, and thyroid carcinomas, oral squamous cell carcinoma, hepatocellular, prostate and nasopharyngeal carcinomas, as well as in cervical cancer cell lines and primary cervical cancers, suggesting that promoter hypermethylation is one of the main mechanisms involved in *E-cadherin* silencing during tumour progression (29,36). However, inactivation of *N-cadherin* through epigenetic mechanisms had been only described in human pancreatic cells (30).

Our results link the *N-cadherin* gene as a common target for transcriptional inactivation by promoter hypermethylation, whereas only a minor fraction of these tumours (4/14) seems to inactivate *E-cadherin* by this same procedure. For this reason, alternative mechanisms such as mutations or epigenetic alterations favoured by the over-expression of specific transcriptional repressors or loss of trans-activating proteins without apparently increasing CpG promoter methylation should also be involved in *E-cadherin* inactivation (14,37–39). For this reason, we have also studied the pattern of transcriptional expression of *Snail*, one of the transcriptional repressors that may inactivate *E-cadherin* through the recruitment of a histone–deacetylase complex to the unmethylated *Cdh1* promoter (40). Though some apparently contradictory results have been described, *Snail* appears to be a candidate repressor of *E-cadherin* in several solid tumours such as breast and gastric carcinomas as well as in hepatocarcinomas (41). Interestingly, it was found that a fraction of the thymic lymphomas exhibiting a reduction in the levels of *E-cadherin* mRNA not accompanied by promoter hyper-methylation did show an over-expression of *Snail*. Such over-expression of *Snail* in these tumours might therefore be involved in the inactivation of *E-cadherin* in these tumours through promoter-histone-deacetylation without promoter DNA-hypermethylation.

Interestingly, we have not observed significant changes in the pattern of methylation at the promoters of *E-* and *N-cadherin* genes in tumour-free mice after aging or radiation

treatments, suggesting that the observed methylation and expression changes detected in tumours appears to be the consequence of tumorigenesis.

These results do not preclude the existence of a possible co-operation of different repressors in *E-cadherin* regulation. In addition, there remain seven lymphomas for which the inhibition of *E-cadherin* remains to be explained. Although, we tried to analyze the expression of other transcriptional inhibitors such as *Slug* (*Snai2*), *E47* and *E12* (*Tcf2a*) through RT-PCR we have been unable to detect their expression in neither control nor tumorous samples (data not shown). More recently some *cis*-regulatory elements have been described in the intron 2 of *E-cadherin* that seems to be essential for gene expression during mouse embryonic development (42).

Taken together these results suggest that γ -radiation-induced thymic lymphomas might result not only from gene alterations occurring in the thymocytes but also from epigenetic alterations involving other genes expressed in stromal cells, thus highlighting the importance of thymus-microenvironment disturbance in the development of these kind of tumours (i.e. the tumour-associated alterations are not in the tumour cells per se, but in the stromal cells). Although there is precedent for this (43), to the best of our knowledge this has been not reported in lymphomas. We propose that an early over-expression of both *E-* and *N-cadherin* in response to single high doses of radiation may be favouring the initial stages of lymphomagenesis probably by enhancing thymocyte proliferation. However, the histopathological disorganization that occurs in the structure of the frank lymphomas in the most advanced stages of tumorigenesis could, at least in part, be attributed to the epigenetic down-regulation of both *E-* and *N-cadherin*. In this regard, we have recently demonstrated that new drugs with DNA demethylating activity, such as zebularine, are able to restore *E-cadherin* expression and at the same time are effective against the development of the described mouse T-lymphomas (44).

Acknowledgements

We thank Dr A. Cano for critically reading this manuscript and for kindly providing us with the mouse monoclonal anti-*E-cadherin*, and Dr A. Morales and M. Villa for useful comments. We also thank E. Martin for providing us with the HaCaT cell line, and M. Nieves and D. Lucas for technical assistance. This work has been supported in part with grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2003–05048), the Lymphoma Network from the Ministry of Health (G03/179), and the Autonomous Community of Madrid (CAM 08.1/0025.1/2003) to Dr J. Fernández-Piqueras.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

1. Brathwaite, O., Bayona, W. and Newcomb, E. (1992) p53 mutations in C57BL/6J murine thymic lymphomas induced by γ -irradiation and N-methylnitrosourea. *Cancer Res.*, **52**, 3791–3795.
2. Malumbres, M., Perez de Castro, I., Santos, J., Melendez, B., Mangués, R., Serrano, M., Pellicer, A. and Fernández-Piqueras, J. (1997) Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4b by deletion and de novo methylation with independence of p16INK4a alterations in murine primary T-cell lymphomas. *Oncogene*, **14**, 1361–1370.
3. Malumbres, M., Perez de Castro, I., Santos, J., Fernández-Piqueras, J. and Pellicer, A. (1999) Hypermethylation of the cell-cycle inhibitor p15INK4b 3'-untranslated region interferes with its transcriptional regulation in primary lymphomas. *Oncogene*, **18**, 385–396.
4. Herranz, M., Santos, J., Salido, E., Fernández-Piqueras, J. and Serrano, M. (1999) Mouse p73 gene maps to the distal part of chromosome 4 and might be involved in the progression of γ -radiation-induced T-cell lymphomas. *Cancer Res.*, **59**, 2068–2071.

5. Meléndez, B., Malumbres, M., Pérez de Castro, I., Santos, J., Pellicer, A. and Fernández-Piqueras, J. (2000) Characterization of the murine p19^{ARF} promoter CpG island and its methylation pattern in primary lymphomas. *Carcinogenesis*, **21**, 817–821.
6. Pérez de Castro, I., Malumbres, M., Santos, J., Pellicer, A. and Fernández-Piqueras, J. (1999) Cooperative alterations of Rb-pathway regulators in mouse primary T-cell lymphomas. *Carcinogenesis*, **20**, 1675–1682.
7. Santos, J., Herranz, M., Fernández, M., Vaquero, C., López, P. and Fernández-Piqueras, J. (2001) Evidence of a possible epigenetic inactivation mechanism operating on a region of mouse chromosome 19 in γ -radiation-induced thymic lymphomas. *Oncogene*, **20**, 2186–2189.
8. Kakinuma, S., Nishimura, M., Sasanuma, S.-I., Mita, K., Suzuki, G., Katsura, Y., Sado, T. and Shimada, Y. (2002) Spectrum of Znf1a1 (Ikaro) inactivation and its association with loss of heterozygosity in radiogenic T-cell lymphomas in susceptible B6C3F1 mice. *Rad. Res.*, **157**, 331–340.
9. Beberly, L. and Capobianco, A.J. (2003) Perturbation of Ikaro isoform selection by MLV integration is a cooperative event in Notch^{IC}-induced T cell leukemogenesis. *Cancer Cell*, **3**, 551–564.
10. Tsuji, H., Ishii-Ohba, H., Ukai, H., Katsube, T. and Ogiu, T. (2003) Radiation-induced deletions in the 5' end region of Notch1 lead to the formation of truncated proteins and are involved in the development of mouse thymic lymphomas. *Carcinogenesis*, **24**, 1257–1268.
11. López, P., Santos, J. and Fernández-Piqueras, J. (2004) Defective expression of Notch1 and Notch2 in connection to alterations of c-Myc and Ikaro in gamma-radiation-induced mouse thymic lymphomas. *Carcinogenesis*, **25**, 1299–1304.
12. Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Inoue, J. et al. (2003) Bcl11b is required for differentiation and survival of $\alpha\beta$ T lymphocytes. *Nature Immunol.*, **4**, 533–539.
13. Anderson, G. and Jenkinson, E.J. (2001) Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature Rev. Immunol.*, **1**, 31–40.
14. Cavallaro, U. and Christofori, G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Rev. Cancer*, **4**, 118–132.
15. Nelson, W.J. and Nusse, R. (2004) Convergent of Wnt, β -Catenin, and Cadherin pathways. *Science*, **303**, 1483–1487.
16. Lee, M.G., Sharrow, S.O., Farr, A.G., Singer, A. and Udey, M.C. (1994) Expression of the homotypic adhesion molecule E-cadherin by immature murine thymocytes and thymic epithelial cells. *J. Immunol.*, **152**, 5653–5659.
17. Munro, S.B., Duclos, A.J., Jackson, A.R., Baines, M.J. and Blaschuk, O.W. (1996) Characterization of cadherins expressed by murine thymocytes. *Cell Immunol.*, **169**, 309–312.
18. Muller, K.M., Lueddeker, C.J., Udey, M.C. and Farr, A.G. (1997) Involvement of E-cadherin in thymus organogenesis and thymocyte maturation. *Immunity*, **6**, 257–264.
19. Kutlesa, S., Wessels, J.T., Speiser, A., Steiert, I., Muller, C.A. and Klein, G. (2002) E-cadherin mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation. *J. Cell Sci.*, **115**, 4505–4515.
20. Puch, S., Armeanu, S., Kibler, C., Johnson, K.R., Muller, C.A., Wheelock, M.J. and Klein, G. (2001) N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation. *J. Cell Sci.*, **114**, 1567–1577.
21. Melki, J.R., Vincent, P.C., Brown, R.D. and Clark, S.J. (2000) Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood*, **15**, 3208–3213.
22. Ohshima, K., Haraoka, S., Yoshioka, S., Kawasali, C., Tutiya, T., Suzumiya, J. and Kikuchi, M. (2001) Chromosome 16q deletion and loss of E-cadherin expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Int. J. Cancer*, **92**, 678–682.
23. Tsutsui, J., Moriyama, M., Arima, N., Ohtsubo, H., Tanaka, H. and Ozawa, M. (1996) Expression of cadherin-catenin complexes in human leukaemia cell lines. *J. Biochem.*, **120**, 1034–1039.
24. Kawamura-Kodama, K., Tsutsui, J., Suzuki, S.T., Kanzaki, T. and Ozawa, M. (1999) N-cadherin expressed on malignant T cell lymphoma cells is functional, and promotes heterotypic adhesion between the lymphoma cells and mesenchymal cells expressing N-cadherin. *J. Invest. Dermatol.*, **112**, 62–66.
25. Santos, J., Perez de Castro, I., Herranz, M., Pellicer, A. and Fernandez-Piqueras, J. (1996) Allelic losses on chromosome 4 suggest the existence of a candidate tumor suppressor gene region of about 0.6 cM in gamma-radiation-induced mouse primary thymic lymphomas. *Oncogene*, **3**, 669–676.
26. Gray, D.H.D., Chidgey, A.P. and Boyd, R.L. (2002) Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **260**, 15–28.
27. Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Dominguez, O., Juan, M., Foz-Sala, M. and Pujol-Borrell, R. (1998) Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J. Immunol.*, **161**, 5918–5929.
28. Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D. and Baylin, S.B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 9821–9826.
29. Di Croce, L. and Pelicci, P.G. (2003) Tumour-associated hypermethylation: silencing E-cadherin expression enhances invasion and metastasis. *Eur. J. Cancer*, **39**, 413–414.
30. Hagihara, A., Miyamoto, K., Furuta, J., Hiraoka, N., Wakazono, K., Seki, S., Fukushima, S., Tsao, M.S., Sugimura, T. and Ushijima, T. (2004) Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene*, **23**, 8705–8710.
31. Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G.J., Ruijter, E.T., Jansen, C.F., Bussemakers, M.J. and Schalken, J.A. (2000) Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.*, **60**, 3650–3654.
32. Lee, G. and Herlyn, M. (2000) Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today*, **6**, 163–169.
33. Hazan, R.B., Kang, L., Whooley, B.P. and Borgen, P.I. (1997) N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes. Commun.*, **4**, 399–411.
34. Hazan, R.B., Philips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L. and Aaronson, S.A. (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol.*, **148**, 779–790.
35. Matabuena, M., Santos, J. and Fernández-Piqueras, J. (2004) Evidence for a new tumour suppressor gene locus for (-radiation-induced thymic lymphoma located on the proximal part of mouse chromosome 18. *Rev. Oncol.*, **6**, 90–93.
36. Esteller, M. (2003) Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol.*, **4**, 351–358.
37. Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F. and Nieto, M.A. (2000) The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biol.*, **2**, 76–83.
38. Tycko, B. (2000) Epigenetic gene silencing in cancer. *J. Clin. Invest.*, **105**, 401–407.
39. Peinado, H., Quintanilla, M. and Cano, A. (2003) Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.*, **278**, 21113.
40. Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M. and Cano, A. (2004a) Snail mediates E-cadherin repression by recruitment of the Sin3A/Histone deacetylase (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 306–319.
41. Peinado, H., Portillo, F. and Cano, A. (2004b) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, **48**, 365–375.
42. Stemmler, M.P., Hecht, A. and Kemler, R. (2005) E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. *Development*, **132**, 965–976.
43. Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P.H., Zhou, X.-P. and Eng, C. (2002) Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nature Genet.*, **32**, 355–357.
44. Herranz, M., Martin-Caballero, J., Fraga, M.F., Ruiz-Cabello, J., Flores, J.M., Desco, M., Marquez, V. and Esteller, M. (2006) The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood*, **107**, 1175–1177.

Received October 25, 2005; revised November 22, 2005;
accepted December 20, 2005

Lack of correlation between DNA copy number and mRNA expression levels of *c-myc* in γ -radiation-induced mouse thymic lymphomas by using quantitative real-time PCR

Javier Santos, Concepción Vaquero, Janet Reyes, Pilar López-Nieva, María Matabuena, María Villa, Pablo Fernández and José Fernández-Piqueras

Departamento de Biología. Laboratorio de Genética Molecular Humana. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Spain.

Background. It is well documented that over-expression of the *c-myc* proto-oncogene occurs in the vast majority of mouse thymic lymphomas induced by γ -irradiation, evidencing the importance of this gene in T-cell lymphomagenesis. However, it remains unknown whether elevated levels of *c-myc* expression are driven by extra *c-myc* copy numbers. **Materials and methods.** Here we use a quantitative test on the basis of real-time PCR to determine the cellular copy number of *c-myc* in a set of 14 γ -radiation-induced thymic lymphomas obtained from (C57BL/6J x BALB/cJ) F1 hybrid mice with increased mRNA *c-myc* expression.

Results. Since 5 out of 14 (35.7%) cases had no extra copy numbers of *c-myc*, gene amplification was obviously not the cause of *c-myc* over-expression in these tumours. In the remaining 9 tumours, *c-myc* over-expression was also accompanied with extra DNA copy numbers. Therefore, *c-myc* amplification might be a consequence of the genomic instability subsequent to the up-regulation of *c-myc*. However, linear regression analysis showed a lack of correlation between increasing DNA copy numbers and mRNA over expression of *c-myc* in these tumours ($r = 0.029$, $p = 0.94$).

Conclusion. De-regulation of *c-myc* does not necessarily imply amplification of this gene in these tumours. This report is, to our knowledge, the first one comparing *c-myc* amplification with expression in lymphomas of the T-cell lineage.

Key words: *c-myc*, gene dosage, mRNA levels, real-time PCR, mouse thymic lymphomas, gamma-irradiation.

Correspondence: J. Santos.
Departamento de Biología.
Laboratorio de Genética Molecular Humana.
Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
Ctra. de Colmenar Viejo, Km. 15. Campus de Canto Blanco.
28049 Madrid. Spain.
E-mail: javier-santos@uam.es

Received 5 July 2005; Revised 2 December 2005;
Accepted 7 December 2005.

Santos J, Vaquero C, Reyes J et al. Lack of correlation between DNA copy number and mRNA expression levels of *c-myc* in γ -radiation-induced mouse thymic lymphomas by using quantitative real-time PCR. *Clin Transl Oncol.* 2006;8 (5):349-53.

INTRODUCTION

The *c-myc* proto-oncogene was originally identified as the cellular homologue of the retroviral *v-myc* oncogene in avian myelocytomatosis virus (ALV)-induced chicken bursal lymphomas 25 years ago¹. It was soon thereafter discovered that the *c-myc* oncogene was activated in human Burkitt's lymphoma as a result of translocations that juxtapose *c-myc* at 8q24 to one of three chromosomes (2, 14, or 22) that contain immunoglobulin genes². Subsequently, an elevated expression of *c-myc* revealed a common denominator in the development of a broad range of human and mouse solid tumours as well as myeloid leukemias and lymphomas³.

Trisomy 15 is a frequent chromosomal aberration found in murine thymic lymphomas regardless of the inducing agent⁴⁻⁸. The relevant event of mouse chromosome 15 contributing to thymic lymphomagenesis is the duplication of the D2/3 region⁹, known to contain the *c-myc* proto-oncogene¹⁰. Interestingly, we have recently reported that *c-myc* is over-expressed in all of the γ -radiation-induced primary thymic lymphomas examined¹¹. Transgenic models have also demonstrated that *c-myc* over-expression leads to thymic lymphomagenesis¹². However, it remains unknown whether *c-myc* over-expression correlates with the number of extra gene copies in these tumours.

To determine the latter, we investigated in this study the cellular copy number of *c-myc* in a set of 14 γ -radiation-induced mouse thymic lymphomas obtained from mice with increased mRNA *c-myc* expression by the use of a quantitative real-time PCR (qRT-PCR) methodology, which has recently proven to be a highly sensitive method to determine the DNA copy num-

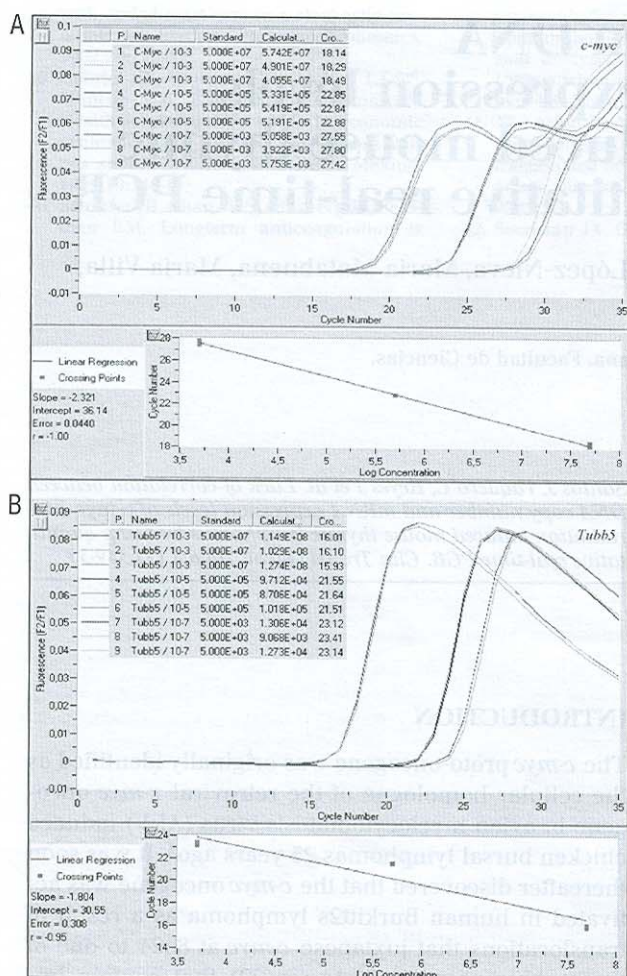


Fig. 1. Construction of the standard curves for *c-myc* (A) and *Tubb5* (B). The amplification curves for reactions with starting *Tubb5* gene fragment copy number ranging from 5×10^7 , 5×10^5 to 5×10^3 . Three replicates were performed for each standard sample. B. Standard curves were constructed by plotting log starting copy number vs crossing point (Cp).

ber of specific genes and a preferable alternative to other forms of quantitative PCR^{13,14}. Our results showed a lack of correlation between increasing *c-myc* copy number and mRNA expression in these tumours.

MATERIALS AND METHODS

Tumour samples

Samples used in this study were obtained from 14 primary thymic lymphomas induced by γ -rays in (C57BL/6J \times BALB/cJ) F1 mice as we described elsewhere¹⁵. DNA was extracted from thymus according to the DNazol method (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA).

Quantitative real-time PCR

For determination of the *c-myc* gene dosage we established a quantification assay on the basis of real-time PCR. The quantification was performed with a LightCycler instrument (Roche Diagnostics Germany) by use of the fluorescence-resonance energy-transfer (FRET) technique¹⁶. This method works with two oligonucleotide probes that bind to the target DNA, one carrying a fluorescent reporter at its 3' end (fluorescein), whereas the other carries a fluorescent acceptor dye at 5' end (LightCycler-Red 640). When the probes bind to the amplified DNA in a head-to-tail arrangement, the dyes are close enough for FRET to occur. A fluorescence detection system of LightCycler measures the amount of the amplification product after each cycle. Real-time fluorescence monitoring on the LightCycler offers a convenient way to identify and measure the log-linear cycles by determining the crossing points (Cp), the cycle which is assumed to represent the same amount of PCR product in every curve. The Cp is considered the most reliably proportional point to the initial concentration because at this point PCR amplification starts to become clearly positive above the background phase. Thus, the copy number of target gene in unknown samples is quantified by measuring Cp and by using a standard curve to determine the number of starting copies. The samples with higher copy numbers show earlier significant increments in fluorescence, which are defined by lower Cp.

Several steps prior to performing a real-time PCR, including cell processing, DNA extraction, DNA storage, and assessment of DNA concentration, may introduce potential variability in the procedure. To compensate for this, the DNA copy number of a tested gene has to be necessarily compared with that of a reference disomic gene. In our assay, we selected the gene encoding the beta 5 chain of tubulin (*Tubb5*) as the control gene for two main reasons. First, this gene is known to be involved in tumour development. Second, *Tubb5* was located in a region of chromosome 17 in which no allelic imbalances (gains or losses) have been found by loss of heterozygosity (LOH) analysis in this type of tumours, as we have previously demonstrated^{17,18}. According to this, the copy number of *c-myc* was expressed, as a quotient, in relation to the copy number of *Tubb5* gene (N) to normalize the amount and quality of DNA.

Two standard curves were generated for the calculation of the amount of PCR product since the *c-myc* and *Tubb5* qrtPCR reactions did not exhibit similar amplification efficiencies. These curves were analyzed by evaluating the slope and the correlation coefficient (r) in each case (figs. 1 and 2). PCR fragments used in the generation of the standard curves were obtained by amplifying 250 nanograms of genomic DNA from a non-treated (C57BL/6J \times BALB/cJ) F1 hybrid with the same primers used later for real-

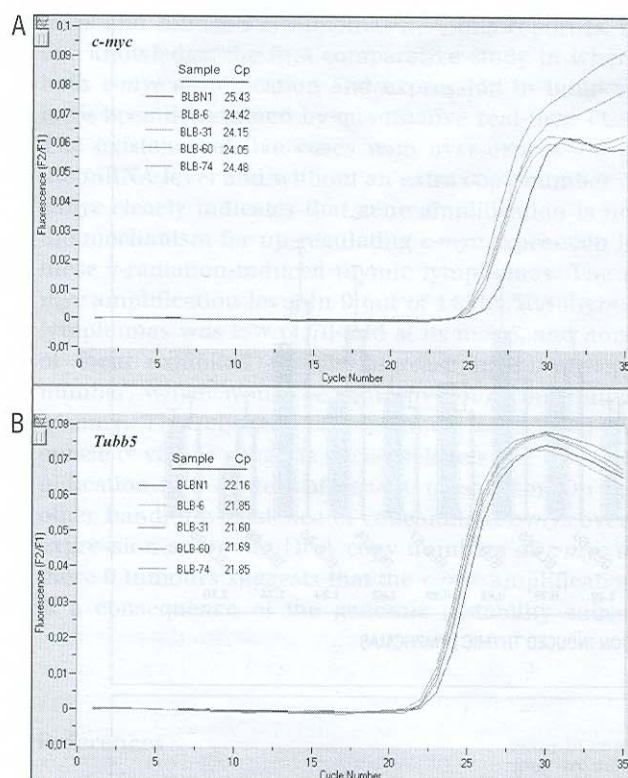


Fig. 2. Representative online fluorescence curves of LightCycler-assisted PCR amplification of *c-myc* (A) and *Tubb5* (B) gene fragments from a control sample (BLBN1) and four γ -radiation thymic lymphomas (BLB-6, BLB-31, BLB-60, and BLB-74). The crossing points (Cp) of *Tubb5* amplicons were very similar in the control and four tumour samples. By contrast, the four thymic lymphomas showed Cp of *c-myc* reactions lower than the normal sample, meaning that *c-myc* was amplified in these tumours.

time PCR, following standard PCR conditions described elsewhere¹⁴. The amplified products were separated on 2% agarose gels, purified with the GeneClean kit (Bio101, Carlsbad, CA, USA) and spectrophotometrically quantified. The standard curves used for the quantitative real-time PCR analysis were constructed with serial dilutions of PCR products in triplicate ranging from 10^{-5} (5×10^7 copies of each gene) to 10^{-7} (5×10^5 copies) (fig. 1).

Primers and FRET probes for *c-myc* were 5'-AGGAGCTGGAATCTCTCGTG-3' (forward), 5'-GTTAAAATTATGGCTGAAGCTTACA-3' (reverse), 5'-TGACAGAAGCTGATGCGCTGGAATTAA-3' (fluorescein) and 5'-ATGCATGCCAAAGCCCTAACCTCACA-3' (LCRed640). For *Tubb5*, 5'-CCTACAATGCCACCCTGTCT-3' (forward), 5'-TTCAGGTCTCCGTAGGTTGG-3' (reverse), 5'-ATCGACAACGAGGCCCTCTACG-3' (fluorescein) and 5'-CATCTGCTTCCGTACCTCAAGCTC-3' (LCRed640). The hybridization probes were designed by TibMolBiol, Berlin, Germany.

Reactions for real-time PCR were performed in a total volume of 20 μ l containing 250 nanograms of total ge-

nomeric DNA, 4 mM of $MgCl_2$, 0.5 μ M of each primer, 0.2 μ M of each probe and 1x LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes mix (Roche). The PCR conditions were: 95 °C for 2 min following by 30 cycles with 95 °C for 10 s, 55 °C for 30 s (in this step the online measurements take place) and 72 °C for 15 s. All PCR reactions for each sample were repeated in three independent experiments.

RESULTS

DNA copy number of *c-myc* was determined by real-time quantitative PCR on genomic DNA extracted from 14 γ -radiation-induced thymic lymphomas obtained from (C57BL/6J \times BALB/cJ) F1 hybrids with increased mRNA *c-myc* expression (fig. 2). To determine the cut-off point for gene amplification in these tumours, three normal thymus DNA samples obtained from untreated (C57BL/6J \times BALB/cJ) F1 hybrid mice were tested for the *c-myc* gene dose (N). The N value of these samples ranged from 0.79 to 0.84 (mean 0.81 ± 0.025 sd). Figure 3 summarizes the cellular copy number of *c-myc* obtained in the three independent experiments performed for the 14 tumour DNA samples. N values for *c-myc* in four tumours (28.6%) fell between 0.75 and 0.89, being therefore indicative of normal *c-myc* copy numbers. By contrast, 9 out of 14 (64.3%) thymic lymphomas consistently showed N values higher than those found in normal thymus, and were considered to represent gene amplification in tumour DNA. Previous to this work, we studied the mRNA levels of *c-myc* in the same set of γ -radiation-induced mouse thymic lymphomas by quantitative real-time LightCycler RT-PCR, demonstrating transcriptional over-expression with normalized expression values that ranged from 1.4 to 5.57-fold increases in all of the analyzed tumours¹¹. Interestingly, we observed frequent discrepancies between the number of extra copies and the levels of mRNA expression of *c-myc* (fig. 3). In this way, tumour BLB60 had a relatively low number of extra copies (N = 1.20) with a 3.01 fold increase in *c-myc* RNA levels. Additionally, one of the tumours with no extra copy number of *c-myc*, BLB30 (N = 0.77), was the one to show the highest mRNA expression (5.57-fold increase). In an opposite way, there was a case (BLB6) with much lower transcriptional expression of *c-myc* (1.40-fold increase) in which real-time PCR showed one of the highest levels of gene amplification (N = 1.75). Linear regression analysis for the nine tumours with *c-myc* amplification showed no association between increasing *c-myc* copy number and increasing *c-myc* mRNA level ($r = 0.029$, $p = 0.94$).

DISCUSSION

In this study we used a real-time PCR system based on the detection and quantification of fluorescent FRET

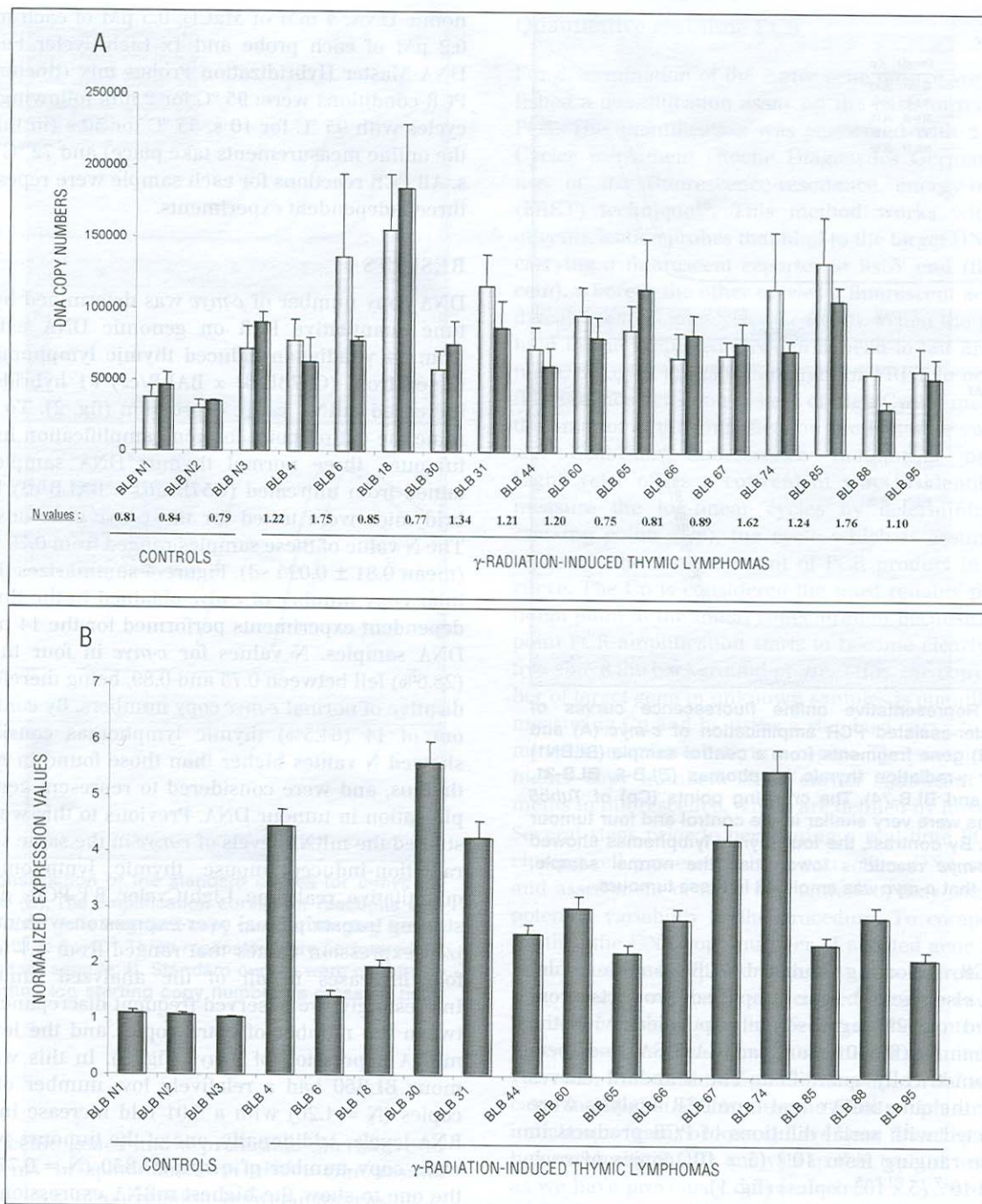


Fig. 3. DNA copy number and mRNA expression levels of *c-myc* in normal thymus and γ -radiation-induced mouse thymic lymphomas. A) *c-myc* and *Tubb5* gene dosage. B) relative mRNA expression of *c-myc*. *Data from López-Nieva et al, 2004¹¹.

reporters to determine *c-myc* gene amplification on mouse primary thymic lymphomas that overexpressed this gene. The DNA amplification levels of *c-myc* we found in normal thymus (mean N value = 0.81) did not significantly differ from those reported by other authors in normal human leukocyte samples (mean N value = 0.84) using the fluorescent Taqman methodology and the *Albumin* gene (*Alb*) as reference

disomic gene¹⁹. Taken together, these data clearly indicate that qrt-PCR is a highly sensitive and reproducible methodological approach that may be used to estimate the *c-myc* copy number in DNA samples.

Although a number of studies have already compared *c-myc* amplification with expression using different methodologies in different types of tumours, including human colorectal cancers, medulloblastomas, leuke-

mias and Burkitt's lymphomas²⁰⁻²², this report is, to our knowledge, the first comparative study in where both *c-myc* amplification and expression in tumours have been determined by quantitative real-time PCR. The existence of five cases with over-expression at the mRNA level and without an extra copy number of *c-myc* clearly indicates that gene amplification is not the mechanism for up-regulating *c-myc* expression in these γ -radiation-induced thymic lymphomas. The *c-myc* amplification level in 9 out of 14 (64.3%) thymic lymphomas was low (1.76-fold at its most), and none of them exhibited 1.5-fold increase in *c-myc* copy number, which would be indicative of a constitutive trisomy. This absence of adjustment to 1.5-fold increase N values suggests variable levels of *c-myc* amplification in a context of genetic mosaicism. On the other hand, the existence of concomitant *c-myc* over-expression and extra DNA copy numbers of *c-myc* in these 9 tumours suggests that the *c-myc* amplification is a consequence of the genomic instability subse-

quent to the up-regulation of *c-myc*. This is in concordance with previous evidence revealing that the de-regulation of certain oncogenes may induce genomic instability^{23,24}. Moreover recent studies analyzing transgenic mice in which *c-myc* was conditionally expressed in lymphoid cells, specifically demonstrated that the over-expression of *c-myc* alone can induce *c-myc* amplification²⁵. However, the lack of correlation between increasing DNA copy numbers and mRNA over-expression of *c-myc* reported here clearly indicates that the de-regulation of *c-myc* does not necessarily imply amplification of this gene in these tumours.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part with funds from the Spanish Ministry of Science and Technology (SAF2003-05048) and the Lymphoma Network from the Ministry of Health and Consume (G03/179) to Fernández-Piqueras J.

References

- Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. Isolation and characterization of *c-myc*, a cellular homolog of the oncogene (*v-myc*) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol*. 1982;42:775-9.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human *c-myc* onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:7824-7.
- Spencer CA, Groudine M. Control of *c-myc* regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res*. 1991;56:1-48.
- McMorrow LE, Newcomb EW, Pellicer A. Identification of a specific marker chromosome early in tumour development in gamma-irradiated C57BL/6J mice. *Leukemia*. 1988;2:115-9.
- Muto M, Chen Y, Kubo E, Mita K. Analysis of early initiating event(s) in radiation-induced thymic lymphomagenesis. *Jpn J Cancer Res*. 1996;87:247-57.
- Vasml WL, Matthews EA, Gillis CP, et al. Distinct chromosomal abnormalities in murine leukemia virus-induced T- and B-cell lymphomas. *Int J Cancer*. 1989;43:1112-9.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumours in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2005;300:489-92.
- Liyanage M, Weaver Z, Barlow C, et al. Abnormal rearrangement within the alpha/delta T-cell receptor locus in lymphomas from *Atm*-deficient mice. *Blood*. 2000;96:1940-6.
- Silva S, Babonits M, Wiener F, Klein G. Further studies on chromosome 15 trisomy in murine T-cell lymphomas: mapping of the relevant chromosome segment. *Int J Cancer*. 1988;41:738-43.
- Banerjee M, Wiener F, Spira J, et al. Mapping of the *c-myc*, *prt-1* and immunoglobulin kappa genes in relation to the mouse plasmacytoma-associated variant (6;15) translocation breakpoint. *EMBO J*. 1985;4:5183-8.
- López-Nieva P, Santos J, Fernández-Piqueras J. Altered expression of *Notch1*, *Notch2*, *c-myc* and *Ikaros* in γ -radiation induced mouse thymic lymphomas. *Carcinogenesis*. 2004;25:1299-504.
- Stewart M, Cameron E, Campbell M, et al. Conditional expression and oncogenicity of *c-myc* linked to a CD2 gene dominant control region. *Int J Cancer*. 1995;55:1023-30.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993;11:1026-30.
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*. 2005;9:189-95.
- Santos J, Pérez de Castro I, Herranz M, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. Allelic losses on chromosome 4 suggest the existence of a candidate tumour suppressor gene region of about 0.6 cM in gamma-radiation-induced mouse primary thymic lymphomas. *Oncogene*. 1996;12:669-76.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997;22:130-9.
- Santos J, Herranz M, Pérez de Castro I, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. A new candidate site for a tumour suppressor gene involved in mouse thymic lymphomagenesis is located on the distal part of chromosome 4. *Oncogene*. 1998;17: 925-9.
- Meléndez B, Santos J, Fernández-Piqueras J. Loss of heterozygosity at the proximal-mid part of mouse chromosome 4 defines two novel tumour suppressor gene loci in T-cell lymphomas. *Oncogene*. 1999;18:4166-9.
- Bieche I, Olivi M, Champeme MH, Vidaud D, Lidereau R, Vidaud M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. *Int J Cancer*. 1998;78:661-6.
- Rochlitz CF, Herrmann R, de Kant E. Over-expression and amplification of *c-myc* during progression of human colorectal cancer. *Oncology*. 1996;55:448-54.
- Hermes J, Neidt I, Luscher B, et al. *c-myc* expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int J Cancer*. 2000;89: 395-402.
- Rothberg PG, Erisman MD, Diehl RE, Rovigatti UG, Astrin SM. Structure and expression of the oncogene *c-myc* in fresh tumour material from patients with hematopoietic malignancies. *Mol Cell Biol*. 1984;4:1096-103.
- Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*. 2002;1:19-30.
- Gray JW, Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumours. *Carcinogenesis*. 2000;21:445-52.
- Marinkovic D, Marinkovic T, Mahr B, Hess J, Wirth T. Reversible lymphomagenesis in conditionally *c-myc* expressing mice. *Int J Cancer*. 2004;20:536-42.